

INAUGURAL - DISSERTATION
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen
Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom- Biologin Cosima Christina Kretz
aus: Bad Kreuznach

Juli 2009

Tag der mündlichen Prüfung:.....

Apoptose im systemischen Lupus erythematodes Einfluss auf Immunantwort und periphere Toleranz

Gutachter Prof. Dr. Lutz Gissmann
Abteilung Genomveränderungen und Karzinogenese
Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg

Prof. Dr. Peter H. Krammer
Abteilung Immunogenetik
Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg

Wir glauben, Erfahrungen zu machen,
aber die Erfahrungen machen uns.

von Eugène Ionesco
(26.11.1909 - 28.03.1994)

Danksagung

Wissenschaft lebt vom Austausch und deswegen möchte ich den Menschen danken, ohne die diese Arbeit niemals zu Stande gekommen wäre.

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Annegret Kuhn für die Überlassung des Themas, die unzähligen Hilfestellungen bei klinischen und organisatorischen Fragen, ihren stetigen Expertenrat zum Thema Lupus und ihre Betreuung danken.

Prof. Dr. Peter H. Krammer danke ich für die Aufnahme in seine Gruppe, die unermüdliche Hilfe bei der Planung und Auswertung der Experimente, seine ständige Bereitschaft zur wissenschaftlichen Diskussion und seine Unterstützung. Seine kritische analytische Auffassung von Wissenschaft hat mich geprägt.

Prof. Dr. Lutz Gissmann danke ich für die Übernahme der Betreuung von Seiten der Universität und das Interesse.

Meinen Kooperationspartnern in der Klinik Prof. Dr. Hanns-Martin Lorenz, Dr. Regina Max, Prof. Dr. Ulf Müller-Ladner, Dr. Ingo Tarner und Prof. Dr. Andreas Schwarting gilt mein besonderer Dank für die gute Zusammenarbeit. Ebenso danke ich Prof. Dr. Lutz Edler für die Hilfestellungen bei der statistischen Auswertung.

Für ihren Enthusiasmus und ihr offenes Ohr bei allen kleineren und größeren Problemen möchte ich PD Dr. Elisabeth Suri-Payer danken.

Meinen Kollegen aus der Annexin-Gruppe Heiko, Lucie, Andrea und Björn möchte ich für die vielen Anregungen danken. Und natürlich gilt mein Dank den Mitgliedern der „Bad side“ Sandra und Michael, die mir den Laboralltag mit ihrer humorvollen Sicht der Dinge versüßt haben.

Ohne die aufgeweckte Diskussion mit dem Rest der Gruppe wären viele Probleme nicht gelöst worden, deshalb geht ein großes Dankeschön an: Angelika, Annette, Carina, Daniel, Dirk, Eva-Maria, Gernot, Inna, Jennifer, Jie, Julia, Karsten, Marcin, Mareike, Markus, Min, Nina, Olga, Rüdiger, Sabine und Thomas, sowie Christine und Daniela für technische Hilfestellungen.

Zum Schluss gilt mein besonderer Dank denen, die mir am Herzen liegen: mein Vater Wolfgang Kretz, der mir früh beigebracht hat, neugierig zu sein, Dinge kritisch zu hinterfragen, mir die Freude am Lernen vermittelt hat und mir bedingungslosen Rückhalt bei der Suche nach meinem eigenen Weg gegeben hat; meinem Bruder Matthias, der sich von meinem Interesse für Naturwissenschaften hat anstecken lassen und meinem Freund Ralph Rieger, der alle Höhen und Tiefen mit mir durchgestanden hat. Danke für die Geduld und die Unterstützung.

Zusammenfassung

Das Immunsystem hat die Aufgabe, körperfremde Substanzen abzuwehren und Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen zu gewährleisten. In Autoimmunerkrankungen, wie z.B. dem systemischen Lupus erythematoses (SLE), ist der Mechanismus der Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen gestört. Eines der wesentlichen phänotypischen Merkmale des SLE ist das Auftreten von Antikörpern gegen zellintrinsische Strukturen, wie z.B. gegen Bestandteile des Zellkerns oder doppelsträngige DNA. In diesem Zusammenhang wurde von verschiedenen Gruppen beschrieben, dass sich im peripheren Blut von Patienten mit SLE vermehrt apoptotische Leukozyten nachweisen lassen, die zur Bildung von Antikörpern beitragen könnten. Da jeden Tag Körperzellen in großer Zahl unter apoptotischen Bedingungen sterben, muss das Immunsystem gewährleisten, dass intrazelluläres Material nicht nach außen dringt und dort als Gefahrensignal Zellen des Immunsystems aktiviert. In der Regel wird dies durch die Aufnahme apoptotischer Zellen durch phagozytierende Zellen, wie z.B. dendritische Zellen (DC) und Makrophagen, erzielt. Außerdem werden insbesondere DC nach Phagozytose von apoptotischem Material in einen weniger reaktiven Zustand versetzt, sezernieren nach Stimulation weniger pro-inflammatorische Zytokine und exprimieren weniger kostimulatorische Moleküle auf der Zelloberfläche. Dadurch wird die Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen durch diese DC verhindert. Sowohl eine erhöhte Apoptoserate als auch eine gestörte Interaktion von DC mit apoptotischen Zellen könnten diesen Mechanismus der peripheren Toleranzinduktion aufheben.

In dieser Arbeit wurde untersucht, in wieweit Zellen von Patienten mit SLE ein verändertes Apoptoseverhalten aufweisen, und ob die Interaktion von apoptotischen Zellen und DC dahingehend verändert ist, dass dies zu einer verminderten peripheren Toleranz führt. Hierbei konnte festgestellt werden, dass sich neutrophile Granulozyten von Patienten mit SLE in Bezug auf die Anzahl und den zeitlichen Verlauf der Apoptose neutrophiler Granulozyten nicht von denen gesunder Kontrollen unterscheiden. Weiterhin zeigen apoptotische neutrophile Granulozyten von Patienten mit SLE ein vergleichbares Verhalten wie neutrophile Granulozyten von gesunden Kontrollen hinsichtlich ihrer suppressiven Eigenschaften auf DC. Außerdem ist die Stimulierbarkeit von DC mit Lipopolysaccharid (LPS) in beiden Gruppen vergleichbar. Zusätzlich ist die Suppression von DC durch apoptotische Zellen von Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen nicht unterschiedlich. Ein zellintrinsischer Defekt von neutrophilen Granulozyten und DC in Patienten mit SLE konnte somit nicht nachgewiesen werden. Annexin 1 ist ein Molekül, das in der Abteilung von Prof. Krammer auf der Oberfläche apoptotischer Zellen gefunden wurde und einen suppressiven Effekt auf DC ausübt. In den durchgeführten Experimenten wurde die Expression auf der Oberfläche apoptoti-

scher neutrophiler Granulozyten untersucht, und die Ergebnisse deuten nicht darauf hin, dass diese bei Patienten mit SLE gestört ist. Jedoch finden sich im Serum von Patienten mit SLE vermehrt Antikörper gegen Annexin 1. Diese haben aber nur einen geringen Effekt auf die Suppression von DC und die Phagozytose apoptotischer Zellen durch DC. Es scheint deswegen unwahrscheinlich, dass dieses System beim SLE zu Veränderungen der peripheren Toleranz führt.

Des Weiteren wurden regulatorische T-Zellen (Treg) im Blut von Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen quantifiziert und charakterisiert. Die Anzahl und die phänotypischen Eigenschaften von Treg erwiesen sich bei Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen als vergleichbar. Zusammenfassend geben diese Ergebnisse Einblick in die Interaktion von apoptotischen Zellen und DC im Bezug auf die periphere Toleranzinduktion beim SLE.

Abstract

The immune system has to guarantee a strong defense against exogenous substances and has to concomitantly assure tolerance against the body's own structures. In autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus (SLE), the mechanisms of tolerance are often disturbed. One of the main phenotypical features of SLE is the occurrence of antibodies against cell intrinsic structures such as anti-nuclear or anti-double stranded DNA antibodies. Several groups described elevated levels of apoptotic leukocytes in peripheral blood of patients with SLE which could account for the generation of antibodies against cell intrinsic structures. Since apoptosis of cells is necessary to sustain tissue homeostasis, it is essential to avoid release of intracellular material, which can act as a danger signal on immune cells. This is generally established by phagocytosis of apoptotic cells by surrounding cells, *e.g.* dendritic cells (DC) and macrophages. Furthermore, the uptake of apoptotic material enables activated DC to secrete less proinflammatory cytokines and to express less costimulatory molecules on their surface and thereby prevents activation of autoreactive T cells. This mechanism can be disrupted by a higher rate of apoptotic cells or an altered interaction of DC and apoptotic cells.

The aim of this study was to analyze if patients with SLE show alterations in apoptosis of leukocytes or the interaction of DC with apoptotic cells, which can lead to the abrogation of peripheral tolerance. The results demonstrate that in patients with SLE, the apoptosis rate of neutrophils seems not to be altered compared to healthy controls. Moreover, suppressive capacity of these cells on DC is comparable between patients with SLE and healthy controls. DC of patients with SLE show similar activation capacity after stimulation with lipopolysaccharid (LPS) compared to healthy controls, which can be suppressed to an equal amount by apoptotic cells. The results do not account for a cell intrinsic defect of the investigated cells. In the group of Prof. Krammer, it was recently found that annexin 1 is a molecule on the surface of apoptotic cells, which has a suppressive effect on DC. In this study, surface expression of annexin 1 on apoptotic neutrophils was tested and shows similar results in patients with SLE compared to healthy controls. However, elevated levels of antibodies against annexin 1 were detected in the serum of patients with SLE. Phagocytosis and suppressive effects of apoptotic cells on DC are not altered by these antibodies making it unlikely to have a major impact on the mechanism of tolerance induction in this disease. In addition, regulatory T cells (Treg) were quantified and phenotypically characterized. These properties are comparable in patients with SLE and healthy controls. In summary, the results of this study provide insight into the interaction of apoptotic cells and DC relating to peripheral tolerance induction in SLE.

Abkürzungsverzeichnis

AIRE	Autoimmunregulatorisches Element
ANA	Antinukleäre Antikörper
anti-dsDNA Antikörper	Autoantikörper gegen doppelsträngige DNA
ACR	American College of Rheumatology
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BILAG	british isle lupus assesment group index
C1q	complement component 1 subcomponent q
cTEC	Epithelzelle des Thymuscortex
CD	cluster of differentiation
CD95L	CD95-Ligand
CLE	cutaneous lupus erythematosus
CpG DNA	Cytosin-Guanin-reiche DNA Sequenzen
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte activation antigen 4
DC	dendritische Zelle
DISC	death inducing signaling complex
DNA	desoxyrybonucleic acid
ECLAM	european consensus lupus activity measurement index
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FC	fragment crystallizable
FoxP3	forkhead box protein 3
FPR	Formylpeptidrezeptor
FPRL1	Formylpeptidrezeptor Ligand 1
GITR	glucocorticoid induced TNF- α -related protein
HLA-DR	human leukocyte antigen complex DR
HMGB-1	high mobility box binding protein 1
ICOS	induzierbarer T-Zelle Kostimulator
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-2R/ β	Interleukin 2 Rezeptor β
INF α	Interferon α
IPEX	immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked
iTreg	induzierte regulatorische T-Zellen
LAG-3	lymphocyte activation gene 3

LPS	Lipopolysaccharid
Lta	Lipoteichonsäure
MBL	mannosebindendes Lektin
MCP-1	monocyte chemoattractive protein-1
MerTK	Mer-Tyrosin-Kinase
MFG-E8	milk fat globular protein E8
MFI	mean fluorescence intensity
MHC	major histocompatibility complex
min	Minuten
mTEC	Epithelzelle der Thymusmedulla
NK-Zelle	natürliche Killerzelle
NKT-Zelle	natürliche Killer-T-Zelle
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drugs
nTreg	natürlich vorkommende regulatorische T-Zelle
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBMC	peripheral blood mononuclear cell
PD-L1	Programmed Death Ligand 1
PMA	Phorbolmyristataacetat
PS	Phosphatitylserin
RAGE	receptor for advanced glycation endproducts
RNA	ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
SLAM	systemic lupus activity measure index
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SLEDAI	SLE disease activity index
t	Tag
Tcon	konventionelle T-Zelle
Teff	T-Effektor-Zelle
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF β	transforming growth factor beta
Th	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	tumor necrosis factor
Tr1	regulatorische T-Zelle, die IL-10 sezerniert
Treg	regulatorische T-Zelle
VDRL-Test	venereal disease research laboratory-test auf Syphilis-Erreger
VG	Vertrauensgrenze (exakt)

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	1
Zusammenfassung	2
Abstract	4
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	10
1.1 Das Immunsystem	10
1.2 Zentrale Toleranz	10
1.3 Periphere Toleranz	11
1.4 Regulatorische T-Zellen	13
1.5 Tolerogene dendritische Zellen	17
1.6 Zelltod: Apoptose und Nekrose	20
1.7 Die Rolle apoptotischer Zellen bei der Toleranzinduktion	22
1.8 Annexin 1 als anti-inflammatorisches Molekül	23
1.9 Systemischer Lupus Erythematodes (SLE)	26
1.10 Zielsetzung der Arbeit	32
2 Material und Methoden	34
2.1 Patienten- und Kontrollkollektiv	34
2.2 Material	37
2.2.1 Chemikalien	37
2.2.2 Häufig verwendete Puffer	37
2.2.3 Eukaryotische Zelllinien	39
2.2.4 Verwendete Antikörper	40
2.2.5 Reagenzien und Geräte	41
2.3 Methoden	43
2.3.1 Aufreinigung von rekombinantem Annexin 1	43
2.3.2 Zytokin-ELISA	44
2.3.3 Annexin 1-ELISA	45
2.3.4 Aufreinigung von Autoantikörpern gegen Annexin 1 aus huma- nem Serum	46
2.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösung	46
2.3.6 Immunopräzipitation von Annexin 1 durch Autoantikörper im Serum von Patienten mit SLE	47
2.3.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	47

2.3.8	Western Blot	48
2.3.9	Kultivierung eukaryotischer Zellen	49
2.3.10	Präparation primärer humaner neutrophiler Granulozyten	49
2.3.11	Präparation primärer humaner Monozyten	50
2.3.12	Präparation primärer humaner Lymphozyten	50
2.3.13	Differenzierung primärer humaner DC	51
2.3.14	Differenzierung von U937-Zellen	51
2.3.15	Apoptose-Induktion	51
2.3.16	Kokultur-Experimente mit apoptotischen Zellen	52
2.3.17	Vybrant DiD-Markierung von J16 T-Zellen	52
2.3.18	Phagozytose-Experimente	53
2.3.19	Durchflusszytometrische Analyse	53
2.3.20	Bestimmung der Apoptose nach Nicoletti	54
2.3.21	Statistische Analyse	55
3	Ergebnisse	56
3.1	Das Apoptoseverhalten neutrophiler Granulozyten von Patienten mit SLE zeigt keine pathologische Veränderung	56
3.2	Apoptotische neutrophile Granulozyten haben einen suppressiven Effekt auf U937-Zellen	57
3.3	Primäre DC von Patienten mit SLE weichen im Bezug auf ihre Stimu- lierbarkeit durch Gefahrensignale nicht von DC aus gesunden Kontrollen ab	59
3.4	Die Supprimierbarkeit durch apoptotische Zellen ist bei DC von Patienten mit SLE im Vergleich zu gesunden Kontrollen nicht vermindert	62
3.5	Apoptotische Zellen von Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen zeigen keine Unterschiede in der Oberflächenexpression von Annexin 1	64
3.6	Etablierung eines Nachweissystems für Antikörper gegen Annexin 1 im Serum	66
3.7	Antikörper aus dem Serum von Patienten mit SLE binden an apoptoti- sche Jurkat T-Zellen	68
3.8	Antikörper haben einen geringen Einfluss auf die Supprimierbarkeit von U937-Zellen	71
3.9	Antikörper haben einen geringen Einfluss auf die Phagozytoserate	71

3.10 Die Anzahl der Treg unterscheidet sich nicht in Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen	72
4 Diskussion	78
4.1 Apoptotische neutrophile Granulozyten von Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen unterscheiden sich weder in ihrem Apoptotseverhalten noch in der Fähigkeit, die Aktivierung von U937-Zellen zu supprimieren	79
4.2 DC von Patienten mit SLE lassen sich in gleichem Maße wie DC von gesunden Kontrollen durch Gefahrensignale stimulieren und werden durch die Aufnahme apoptotischer Zellen supprimiert	82
4.3 Das Serum von Patienten mit SLE enthält Autoantikörper gegen Annexin 1	83
4.4 Treg sind in Anzahl und Phänotyp nicht verändert	84
4.5 Die Auswahl der Patienten spielt möglicherweise eine Rolle für die erzielten Ergebnisse	86
4.6 Zytokine und andere lösliche Faktoren haben einen Einfluss auf die Toleranzinduktion	87
4.7 Modell der Krankheitsentwicklung im SLE	89
4.8 Ausblick	91
Abbildungsverzeichnis	94
Literaturverzeichnis	95
Erklärung	115

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Alle Organismen sind ständig den Einflüssen der Umwelt ausgesetzt, von denen einige eine schädliche Wirkung haben können. Insbesondere Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten können das physiologische System des Organismus zum Erliegen bringen. Das Immunsystem ist mit Hilfe von zellulären und humoralen Elementen in der Lage, Erreger aus dem Organismus zu entfernen. Um eine effektive Abwehr eingedrungener Krankheitserreger zu gewährleisten und einer Schädigung körpereigener Strukturen vorzubeugen, dienen in Vertebraten sowohl angeborene als auch erworbene Mechanismen zur Unterscheidung von „Fremd“ und „Selbst“. Die Komponenten der erworbenen Immunität weisen im Gegensatz zu den Komponenten der angeborenen Immunität eine große Anpassungsfähigkeit ihrer Rezeptoren auf, mit denen sie eingedrungene Erreger erkennen können. Diese Anpassungsfähigkeit birgt jedoch die Gefahr, dass körpereigene Strukturen erkannt werden und sich das Immunsystem gegen den eigenen Organismus richtet. Deswegen wird durch die Mechanismen der Toleranzinduktion die Nichtreaktivität der Immunzellen gegenüber körpereigenen Strukturen wirksam überwacht. Diese Kontrolle erfolgt sowohl zentral im Knochenmark und im Thymus als auch in den peripheren Geweben.

1.2 Zentrale Toleranz

Die Zellen des Immunsystems entstehen aus Vorläuferzellen im Knochenmark. Weil autoreaktive B- und T-Zellen eine große Gefahr für den Organismus darstellen, ist eine frühe Eliminierung besonders wichtig. Die meisten autoreaktiven B-Zellen werden bereits im Knochenmark eliminiert (Goodnow et al. 1988; Wardemann et al. 2003), während autoreaktiven T-Zellen im Thymus, dem Organ der zentralen T-Zell-Toleranz, beseitigt werden (Übersicht in Kyewski and Klein 2006). Täglich wandern 10-100 T-Zell-Vorläufer vom Knochenmark in den Thymus (Shortman et al. 1990), proliferieren dort und exprimieren einen jeweils einzigartigen T-Zell-Rezeptor. T-Zell-Rezeptoren sind darauf ausgelegt, an die Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplex (engl.: Major Histocompatibility Complex, MHC) zu binden, die Peptide präsentieren. Da Epithelzellen des Thymuscortex (engl.: cortical thymic epithelial cells, cTEC) diese

Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, stellen sie natürliche Interaktionspartner für T-Zellen im Thymus dar. Beim Prozess der positiven Selektion werden durch eine erfolgreiche Bindung des T-Zell-Rezeptors an ein MHC-Molekül Überlebenssignale in der T-Zelle angeschaltet, während die nicht interagierenden Zellen sterben.

T-Zellen, die stark an körpereigene Peptid-MHC-Komplexe binden, stellen eine Gefahr für den Organismus dar und werden im zweiten Schritt, der so genannten negativen Selektion, eliminiert (Abb. 1). Dazu wandern positiv selektierte Zellen vom Cortex in die Medulla des Thymus. Hier treffen sie auf residente dendritische Zellen (DC) und thymische Epithelzellen (engl.: medullary thymic epithelial cells, mTEC), die körpereigene Peptide auf ihren MHC-Molekülen präsentieren. Um ein möglichst breites Repertoire körpereigener Peptide zu generieren, ist die gewebe- und entwicklungsspezifische Regulation der Genexpression in den mTEC teilweise aufgehoben und steht unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors AIRE (Autoimmunregulatorisches Element) (Derbinski et al. 2001; Anderson et al. 2002). Durch diese promiskuitive Genexpression kann auch gegen Proteine zentrale Toleranz aufgebaut werden, die nicht für die Physiologie der Thymuszellen benötigt werden. Wenn ein T-Zell-Rezeptor stark an einen MHC-Peptid-Komplex bindet, wird die Apoptose der T-Zelle induziert. Jedoch ist die negative Selektion kein Prozess, der ein vollständiges Ergebnis erreicht. Schwach autoreaktive Zellen werden häufig nicht erkannt und entgehen der Eliminierung (Bouneaud et al. 2000). Um dennoch einen Schutz vor Autoimmunität zu gewährleisten, existieren die Mechanismen der sogenannten peripheren Toleranz.

1.3 Periphere Toleranz

Die periphere Toleranz stellt ein Kontrollsystem zum Schutz vor Autoimmunreaktionen dar, bei dem unterschiedliche Mechanismen eine Rolle spielen (Abb. 1). Diese Überwachung ist wichtig, da T-Zellen, die der negativen Selektion im Thymus entgangen sind und autoreaktives Potenzial besitzen, auf Körperzellen treffen können, die ihr spezifisches Antigen auf der Oberfläche präsentieren. Es kommt zur Bindung des T-Zell-Rezeptors an das Antigen, und eine Signaltransduktionskaskade wird in Gang gesetzt. Um eine vollständige Aktivierung der T-Zelle hervorzurufen, werden jedoch zusätzlich Signale von kostimulatorischen Rezeptoren benötigt, die sich in der Regel nur auf Immunzellen befinden. Das unvollständige Signal führt zu einer Inaktivierung der T-Zelle. Man spricht vom Zustand der Anergie (Greenwald et al. 2005; Macian

et al. 2004).

Daneben stellt die immunologische Ignoranz ein natürliches Hindernis der Autoreaktivität von T-Zellen dar. Darunter versteht man den Umstand, dass sehr viele körpereigene Peptide nur in geringen Mengen vorhanden oder für T-Zellen unzugänglich sind (Kurts et al. 1999).

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass ein weiterer Mechanismus existiert, der dem der zentralen Toleranzinduktion sehr ähnlich ist. Stromazellen des Lymphknotens transkribieren durch die Aktivität des Transkriptionsfaktors AIRE promiskuitiv Gene, die physiologisch in unterschiedlichen Geweben aktiv sind und deren Produkte teilweise nur intrazellulär vorkommen. Nach der Translation präsentieren sie die Peptide, die aus diesen Proteinen entstehen, auf MHC II-Molekülen und eliminieren T-Zellen, die in diesem Kontext mit ihnen interagieren (Lee et al. 2007).

Da dennoch manchmal autoreaktive T-Zellen aktiviert werden, existiert zusätzlich die Möglichkeit, eine bereits bestehende Aktivierung zu unterdrücken. Dies spielt auch bei der Feinstuerung von Entzündungsreaktionen im Kontext der Abwehr von Pathogenen eine Rolle. T-Zellen, die andere T-Zellen abschalten können, werden regulatorische T-Zellen (Treg) genannt. Die durch Treg vermittelte Toleranz ist dominant und kann durch T-Zell-Transfer auf andere Individuen übertragen werden (Kyewski and Derbinski 2004).

Des Weiteren existiert ein Mechanismus, um Toleranz gegenüber intrazellulären Antigenen aufrecht zu erhalten. Dies ist notwendig, da im Zuge der Gewebshomöostase täglich ca. acht Milliarden Zellen sterben, aus denen intrazelluläre Proteine freigesetzt werden könnten (Vaux and Korsmeyer 1999). Die sterbenden Zellen werden von umliegenden Zellen und professionellen Phagozyten wie dendritischen Zellen (DC) und Makrophagen aufgenommen, ohne diese dabei zu aktivieren. Im zweiten Schritt wandern insbesondere die DC zu den Lymphknoten und präsentieren Antigene aus den phagozytierten Zellen in MHC-Molekülen auf ihrer Oberfläche. T-Zellen, die in diesem Umfeld an die MHC-Moleküle mit Selbst-Antigenen binden, verlieren ihre Effektorfunktion (Huang et al. 2000). Da Antigene, die über den Weg der Aufnahme aus dem Extrazellularraum in die Zelle gelangt sind, überwiegend in Verbindung mit MHC Klasse II präsentiert werden, sind von diesem Mechanismus in erster Linie $CD4^+$ T-Zellen betroffen. Vor allem in DC existiert aber auch eine Verbindung zwischen den Mechanismen der Beladung von MHC Klasse I und II, sodass körpereigene Peptide auch in MHC I-Molekülen an $CD8^+$ T-Zellen präsentiert werden können. Dieser Prozess wird als Kreuzpräsentation

bezeichnet (Kurts et al. 1997; Albert et al. 2001). Der Aktivierungszustand der DC ist entscheidend für die Toleranzinduktion (Lutz and Schuler 2002). DC können bei einer Interaktion mit Pathogenen durch spezifische Signale, wie z.B. Bestandteile der Bakterienmembran, aktiviert werden und durchlaufen einen Reifungsprozess. Ebenso kann auch der Einfluss pro-inflammatorischer Zytokine zur Aktivierung und Reifung der DC führen. Generell spricht man bei Signalen, die pro-inflammatorisch wirken, von Gefahrensignalen, da sie den Organismus in einen Zustand der Abwehrbereitschaft versetzen. DC, die nach Aufnahme von Antigenen in Abwesenheit von Gefahrensignalen nicht vollständig gereift sind, können T-Zell-Toleranz induzieren. Verschiedene Mechanismen wie Deletion der T-Zellen, Anergisierung oder Erzeugung von Treg wurden für die Toleranzinduktion beschrieben. Es ist wahrscheinlich von der jeweiligen Situation abhängig, welche Mechanismen eine Rolle spielen, bzw. welcher Mechanismus überwiegt.

1.4 Regulatorische T-Zellen

Bereits vor über 30 Jahren wurde die Hypothese aufgestellt, dass es eine T-Zell-Population mit suppressiven Eigenschaften gibt (Droege 1971; Gershon et al. 1972). Nishizuka und Sakakura (1969) beschrieben bereits vorher, dass es sich dabei um einen Mechanismus der dominanten Toleranz handelt. Sie zeigten, dass T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankungen in Mäusen auftreten, wenn den Tieren drei Tage nach der Geburt der Thymus entfernt wurde. Die Subpopulation von T-Zellen, die normalerweise Autoimmunerkrankungen verhindert, konnte nur in Anwesenheit des Thymus entstehen. In den darauffolgenden Jahre entbrannte ein Streit über die Existenz dieser Subpopulation, der erst von Sakaguchi und Kollegen durch die Beschreibung muriner $CD4^+$ T-Zellen mit suppressiven Eigenschaften (Sakaguchi et al. 1995) beigelegt wurde. Diese Zellen exprimieren die Interleukin-2-Rezeptor- α -Kette (CD25) auf ihrer Oberfläche und unterscheiden sich dadurch von den konventionellen $CD4^+$ T-Zellen (engl.: conventional T cells, Tcon). $CD4^+ CD25^+$ T-Zellen waren in der Lage Autoimmunerkrankungen zu verhindern, wenn sie in neonatal thymektomierte Mäusen injiziert wurden (Sakaguchi et al. 1995; Suri-Payer et al. 1998). Auf Grund des regulatorischen Phänotyps wurden diese Zellen Treg genannt. Im Jahre 2001 wurde eine T-Zell-Population mit ähnlichem Phänotyp auch im Menschen beschrieben (Dieckmann

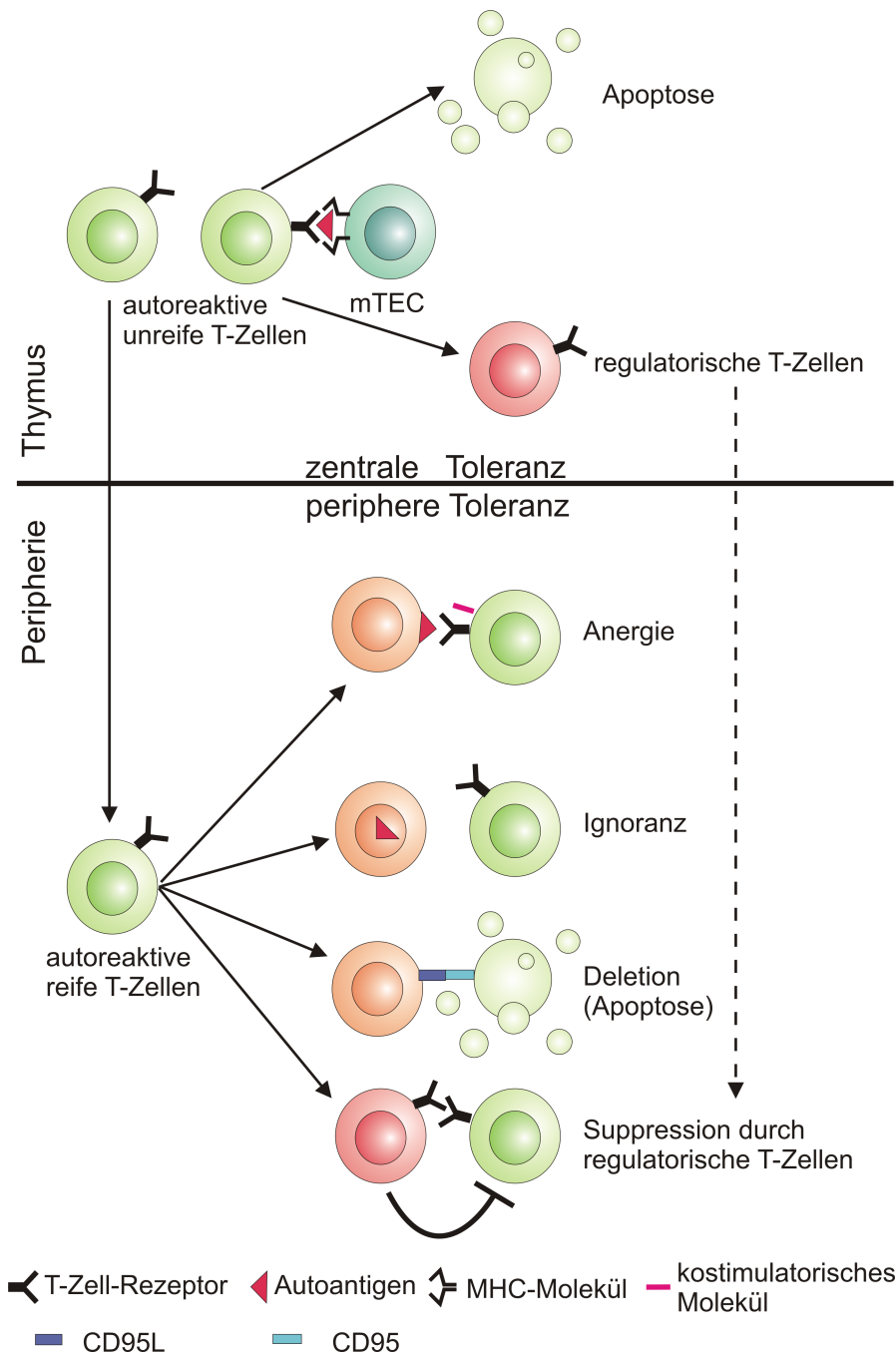


Abbildung 1: Zentrale und periphere Toleranz in Bezug auf T-Zellen. Schematische Darstellung der Toleranzinduktion im Thymus und in der Peripherie. Autoreaktive unreife T-Zellen erkennen im Thymus Selbstantigene im Zusammenhang mit MHC auf mTEC. Dies führt zur Induktion von Apoptose oder konvertiert die Zellen zu Treg, die in die Peripherie auswandern und dort ihrerseits autoreaktive T-Zellen supprimieren können. Ein Teil der autoreaktiven unreifen T-Zellen gelangt in die Peripherie, und dort verhindern die Mechanismen der peripheren Toleranz eine schädliche Wirkung: der Kontakt von T-Zellen mit dem Selbst-Antigen ohne kostimulatorisches Signal führt zu Anergie. Als weitere Möglichkeit der peripheren Toleranz wird eine Reaktion gegen Selbstantigen verhindert, indem diese für die T-Zellen nicht zugänglich sind (Ignoranz). Außerdem besteht die Möglichkeit der Induktion von Apoptose durch erneute Stimulation des T-Zellrezeptors sowie eine nachfolgende Sensitivierung durch erhöhte CD95-Expression und Stimulation von CD95 durch CD95L (CD95-Ligand).

et al. 2001; Jonuleit et al. 2001). Obwohl später für bereits aktivierte Effektor-T-Zellen (Teff) gezeigt werden konnte, dass diese ebenfalls CD25 exprimieren, ist diese Expression transient und fällt sehr viel schwächer aus.

Kokultorexperimente von Treg und Tcon *in vitro* zeigten, dass Treg in der Lage sind, die Aktivierung und die Zytokin-Produktion sowie die Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu unterdrücken (Piccirillo and Shevach 2001; Thornton and Shevach 1998). Die Hemmung der Aktivierung und/oder Expansion naiver T-Zellen wird als die Hauptfunktion von Treg angesehen. Daneben können sie aber auch Teff und Gedächtnis-T-Zellen supprimieren und B-Zellen an der Proliferation, der Produktion von Antikörpern, sowie am Wechsel der Antikörperklasse hindern (Levings et al. 2001; Suvas et al. 2003; Lim et al. 2005; Nakamura et al. 2004; Lim et al. 2005). Des Weiteren wurde eine Hemmung zytotoxischer Zellen, wie natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) und natürlicher Killer-T-Zellen (NKT-Zellen), sowie Antigen-präsentierender Zellen wie DC beobachtet (Ghiringhelli et al. 2005; Azuma et al. 2003; Misra et al. 2004). Im Gegensatz zu Tcon proliferieren Treg nach Aktivierung nicht, da sich die Zellen in einem Zustand der Anergie befinden.

Die Population der Treg beträgt in der Maus 5-10 % aller CD4⁺-T-Zellen, während im Menschen nur 1-2 % der CD4⁺-T-Zellen einen Treg-Phänotyp aufweisen (Baecher-Allan et al. 2001). Neben den natürlich vorkommenden Treg (nTreg), die im Thymus entstehen (Sakaguchi et al. 1995, 1996), eine erhöhte Affinität zu Selbst-Peptiden aufweisen und nicht durch die negative Selektion eliminiert werden (Apostolou et al. 2002; Gounari et al. 2001; Jordan et al. 2001; Sakaguchi et al. 2003), findet man auch induzierte Treg (iTreg). Diese können in der Peripherie aus naiven T-Zellen durch die Blockade von CD40L in Kombination mit einer Stimulation von CD4 oder CD8, sowie durch die Stimulation mit hohen Konzentrationen von TGF β (engl.: transforming growth factor beta) und/oder suboptimale Stimulation des T-Zell-Rezeptors entstehen (Chen et al. 2003; Cobbold et al. 2004; Fantini et al. 2004; Fu et al. 2004; Rao et al. 2005; Waldmann et al. 1998). Ob diese Konversion von Tcon zu Treg auch unter physiologischen Bedingungen in nennenswertem Maße im Menschen stattfindet, ist Gegenstand der aktuellen wissenschaftlichen Debatte. Jonuleit et al. (2002) beobachteten, dass Treg nicht nur die Proliferation von Tcon unterbinden, sondern die Zellen auch zur Differenzierung in sogenannte Tr1- oder Th3-Zellen bringen. Diese Zellen weisen ebenfalls einen regulatorischen Phänotyp auf und hemmen weitere Tcon über die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine wie Interleukin-10 (IL-10) und TGF β . Dieses

Phänomen der Übertragung des tolerogenen Phänotyps wird als infektiöse Toleranz bezeichnet.

Der Mechanismus der Konversion von Tcon zu Treg ist weitgehend ungeklärt. In der Maus spielen *in vivo* neben Zytokinen (TGF β) (Chen et al. 2001) Antigen-präsentierende Zellen eine wichtige Rolle, da Mäuse, die keine B7-Moleküle besitzen, keine Treg gegen periphere Antigene erzeugen können (Lohr et al. 2003). In den meisten experimentellen Modellen ist daher die Erzeugung von iTreg eng mit dem Auftreten tolerogener DC verknüpft.

Phänotypisch zeichnen sich nTreg nicht nur durch die Positivität für CD4 und CD25 aus, sondern auch durch eine konstitutive intrazelluläre Expression von CTLA-4 (engl.: cytotoxic T-lymphocyte activation antigen 4) (Read et al. 2000) und des Transkriptionsfaktors FoxP3 (engl.: forkhead box protein 3) als essentiell wichtige Faktoren für die Aufrechterhaltung der regulatorischen Aktivität (Übersicht in Sakaguchi 2004). CTLA-4- oder FoxP3-defiziente Mäuse entwickeln schon nach kurzer Zeit schwere Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Thyroiditis, Gastritis, Insulitis, Sialoadenitis, Adrenitis, Oophoritis, Glomerulonephritis, and Polyarthritits (Waterhouse et al. 1995; Brunkow et al. 2001; Sakaguchi et al. 1995). Nach der Aktivierung exprimieren sowohl Teff als auch Treg CTLA-4 auf der Zelloberfläche, jedoch ist die Expression auf Treg stärker. Patienten mit Mutationen in der DNA-Bindedomäne von FoxP3 leiden am IPEX-Syndrom (engl.: immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) (Bennett et al. 2001). Das genetische Equivalent zum IPEX-Syndrom ist die Scurfy-Maus. Es handelt sich dabei um einen Mausstamm mit X-gekoppelten rezessiven Mutationen im *foxp3*-Gen, der durch lymphoproliferative Störungen charakterisiert ist. Besonders auffällig ist dabei die exzessive Proliferation von CD4⁺ T-Zellen und die starke Infiltration von Immunzellen in multiple Organe (Brunkow et al. 2001).

In den letzten Jahren wurde im Zuge der Charakterisierung von Treg verstärkt nach einem eindeutigen Treg-Oberflächenmarker gesucht. Da die Expression von CD25 auf menschlichen Zellen nicht sehr hoch ist, ist die Gewinnung einer reinen Treg-Population in ausreichender Menge schwierig. Nur 1-3 % der CD4⁺ T-Zellen mit der höchsten CD25-Expression haben suppressive Eigenschaften. Hinzu kommt, dass alle CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors CD25 exprimieren (Baecher-Allan et al. 2001). In funktionellen Kokultorexperimenten erwiesen sich jedoch nur die Zellen mit einer sehr starken CD25-Expression als suppressiv. In weiteren Untersuchungen wurde eine erhöhte Expression der folgenden Moleküle auf humanen Treg gefunden: GITR

(engl.: glucocorticoid induced TNF- α -related protein), CD71, HLA-DR (engl.: human leukocyte antigen complex DR), LAG-3 (engl.: lymphocyte activation gene 3), IL-2R β (engl.: interleukin 2 receptor β , CD122), IL-2R γ (engl.: interleukin 2 receptor γ , CD132), PD-L1 (engl.: programmed death ligand 1), ICOS (engl.: inducible T-cell co-stimulator), sowie CD45RO, das auch einen Marker für Gedächtnis-T-Zellen darstellt (Baecher-Allan et al. 2004). Die meisten der genannten Moleküle werden jedoch auch von aktivierten T-Zellen exprimiert und eignen sich dadurch nicht als alleinige Marker für Treg. Ein spezifischer Zelloberflächenmarker für Treg, der nicht auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird, wurde bislang nicht beschrieben. In den letzten Jahren wurde die Verwendung von IL-7R α (engl.: interleukin 7 receptor α , CD127) in Kombination mit CD25 zur Aufreinigung von intakten Treg vorgeschlagen, da humane Treg im Gegensatz zu aktivierten Teff kein IL-7R α auf der Oberfläche exprimieren (Seddiki et al. 2006; Liu et al. 2006; Hartigan-O'Connor et al. 2007). Jedoch exprimierten nur ca. 60 % der aufgereinigten IL-7R α -negativen Population FoxP3. Außerdem ist eine nicht unbeträchtliche Population von Treg positiv für die Expression von CD127 (Klein 2007). Bis jetzt wird der intrazelluläre Transkriptionsfaktor FoxP3 als einziger eindeutiger Marker für Treg angesehen. FoxP3 wird jedoch auch von aktivierten T-Zellen im Menschen kurzzeitig schwach exprimiert, wodurch nur eine hohe Expression als eindeutiges Merkmal für Treg angesehen wird.

Der molekulare Mechanismus der Hemmung durch Treg ist bisher nicht geklärt. Während *in vitro*- und in einigen *in vivo*-Modellen ein Zellkontakt zwischen Treg und Tcon erforderlich ist, wird die Hemmung in anderen *in vivo*-Modellen offenbar durch die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine wie TGF β und IL-10 vermittelt (Übersicht in Vignali et al. 2008). Auffällig ist, dass die Aktivierung der Treg antigenspezifisch über den T-Zell-Rezeptor erfolgt, die Antigenpezifität bei der anschließenden Hemmung der Tcon jedoch keine Rolle mehr spielt (Thornton and Shevach 2000). Wenn Treg einmal aktiviert wurden, können sie eine polyklonale T-Zell-Aktivierung unterdrücken.

1.5 Tolerogene dendritische Zellen

Neben T-Zellen spielen DC eine entscheidende Rolle für die Aufrechterhaltung der Toleranz. Als professionelle Antigen-präsentierende Zellen sind sie in vielen Geweben und interstitiellen Räumen zu finden (Banchereau et al. 2000). Dort nehmen

sie infektiöses Material durch Phagozytose oder Makropinozytose auf und verdauen es anschließend lysosomal. Die Aktivierung der DC durch das aufgenommene infektiöse Material führt zu einer Abnahme der Phagozytose-Kapazität und einer vermehrten Expression von MHC-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen der B7-Familie. Die DC präsentieren vermehrt Antigene aus dem phagozytierten Material und wandern in die Lymphknoten, wo T-Zellen mit den präsentierten Antigenen in Kontakt kommen. Eine Aktivierung der T-Zellen hängt von den Signalen ab, die DC zur Verfügung stellen (Lutz and Schuler 2002). Neben dem Signal durch die Bindung des Peptid-MHC-Komplexes benötigen T-Zellen auch eine Kostimulation durch Moleküle der B7-Familie (hauptsächlich CD80 und CD86), an die sie mit ihren Liganden, wie z.B. CD28, binden. Auf der Seite der T-Zelle existieren aber auch inhibitorische B7-Liganden, wie z.B. CTLA-4, deren Bindung in einem späteren Stadium der Immunantwort zu einer Abschaltung der Signalkaskade und damit zu einer Herunterregulation der Entzündungsreaktion führt. Neben diesen Faktoren spielt auch der Einfluss von Zytokine eine Rolle (Greenwald et al. 2005; Corthay 2006). DC sind z.B. in der Lage, nach Aktivierung pro-inflammatorische Zytokine, wie z.B. TNF (engl.: tumor necrosis factor), IL-12 und IL-6, zu sezernieren.

Meist werden DC über *Toll-like*-Rezeptoren (TLR) aktiviert. Diese Moleküle gehören zum System der angeborenen Immunität. Im Menschen sind 11 und in der Maus 13 Vertreter dieser Familie beschrieben. TLR 1, 2, 4, 5 und 6 befinden sich in der äußeren Plasmamembran und erkennen so genannte pathogenassoziierte molekulare Muster (engl.: pathogen-associated molecular pattern = PAMP) auf Zellwänden von Bakterien, z.B. Lipopolysaccharid (LPS), Lipoteichonsäure (Lta) oder Flagellin (Janeway 1989). TLR 3, 7, 8 und 9 sind in intrazellulären Membranen lokalisiert und ragen mit der Rezeptordomäne ins Zytosol. Sie erkennen intrazelluläre Gefahrenmoleküle, wie z.B. doppelsträngige virale RNA oder bakterielle CpG DNA-Sequenzen (Lasker and Nair 2006). DC phagozytieren nicht nur Pathogene, sondern sind auch an der Aufnahme apoptotischer Körperzellen beteiligt. Da DC im Kontext einer Infektion leicht aktiviert werden und dadurch autoreaktive T-Zellen stimulieren können, liegt die Überlegung nahe, dass es in diesem Zusammenhang auch tolerogene Mechanismen geben muss. In der Tat wurde beobachtet, dass DC, die apoptotisches Material aufgenommen haben, Toleranz hervorrufen, indem sie in T-Zellen Anergie induzieren (Hawiger et al. 2001; Kawahata et al. 2002), Treg induzieren (Chen et al. 2003; Apostolou and von Boehmer 2004) oder durch wiederholte Stimulation der T-Zellen diese in die Apoptose führen (deletierender

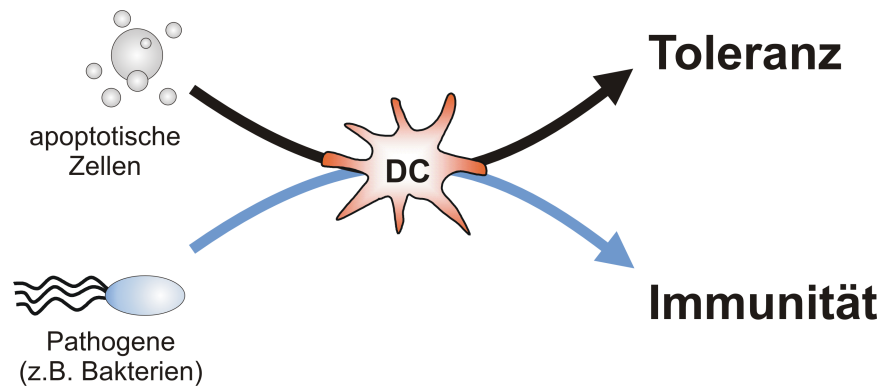


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Induktion tolerogener DC. Durch Phagozytose von apoptotischen Zellen werden DC in einen tolerogenen Zustand versetzt und unterstützen durch Nichtreaktivität gegenüber den aufgenommenen körpereigenen Strukturen die periphere Toleranz. Durch Gefahrensignale wie Pathogene werden DC aktiviert und führen zu Immunität.

T-Zell-Proliferation durch aktivierungsinduzierten Zelltod) (Albert et al. 2001). Auch hier findet also offenbar eine Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Fremd“ statt, die eine differenzierte Reaktion der DC zur Folge hat und zur Aufrechterhaltung der Toleranz gegen körpereigenes apoptotisches Material führt (Abb. 2).

Für tolerogene DC wurden folgende Eigenschaften in unterschiedlichen Systemen beschrieben: Antigenpräsentation, niedrige Expression von MHC und kostimulatorischen Molekülen, wie z.B. CD80 und CD86, bei hoher Expression von PD-L1. Außerdem eine geringe Produktion von IL-12p70 und hohe Produktion von IL-10 und IDO (Indolamin-2,3-Dioxygenase), sowie Resistenz gegenüber Reifung nach Stimulation mit Gefahrensignalen über z.B. TLR. Sie können die Fähigkeit besitzen, alloantigen-spezifische nTreg zu generieren, zu selektieren und/oder zu expandieren. Sie können außerdem Apoptose in T-Zellen fördern und auf Treg mit Hochregulation der Expression inhibitorischer Moleküle reagieren und rufen damit eine inhibitorische Rückkopplung hervor (Fallarino et al. 2003). Zudem sind sie in der Lage, zu den T-Zell-Zonen in den sekundären lymphatischen Organen zu wandern. Außerdem sind sie gegenüber NK- und T-Zell-vermittelter Apoptose resistent.

Zunächst wurde angenommen, dass das Reifestadium der DC eine entscheidende Rolle in der Toleranzinduktion dieser Zellen spielt. Da Jonuleit et al. (2000) zeigen konnten, dass Treg *in vitro* durch längere Kokultur von Tcon mit unreifen DC entstehen und Huang et al. (2000) berichteten, dass mit Selbst-Antigen beladene unreife DC in der Lage sind, in den Lymphknoten zu wandern, wurde die Hypothese aufgestellt, dass unreife DC tolerogen sind und reife DC inflammatorisch wirken. Dieser Standpunkt hat sich aber dahingehend gewandelt, dass ein gewisser Grad an Reife notwendig ist,

um ein effizientes Prozessieren und Präsentieren der Selbstantigene zu gewährleisten. Man spricht hier von semireifen DC, die sich durch eine erhöhte Expression von MHC II, CD80 und CD86, sowie eine vermehrte Expression von IL-10 im Vergleich zu unreifen DC auszeichnen, aber kein TNF und IL-12 sezernieren (Lutz and Schuler 2002). Außerdem sind diese semireifen DC *in vitro* im humanen System in der Lage, Tcon in Treg zu konvertieren (Lutz and Schuler 2002). Das Zytokinmilieu spielt hierbei eine entscheidende Rolle.

Die tolerogenen DC erweitern also das Spektrum der Zellen, die in den peripheren Geweben für eine Aufrechterhaltung der Toleranz sorgen. Offensichtlich interagieren sie dabei eng mit Treg, wobei positive Rückkopplungsmechanismen eine wichtige Rolle spielen. In einer Vielzahl von Experimenten konnte sowohl gezeigt werden, dass tolerogene DC Treg induzieren (Akbari et al. 2001; McGuirk et al. 2002; Menges et al. 2002; Faunce et al. 2004), als auch umgekehrt tolerogene DC von Treg induziert werden können (Chang et al. 2002).

1.6 Zelltod: Apoptose und Nekrose

Apoptotische Zellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Toleranzinduktion. Jeden Tag sterben zahlreiche Zellen unter apoptotischen Bedingungen, das heißt die Zellen werden durch bestimmte Reize dazu angeregt, ein kontrolliertes Zelltodprogramm zu durchlaufen. Ihre Beseitigung erfolgt ohne Anzeichen einer Entzündung und trägt sogar zur peripheren Toleranz gegen Selbst-Antigene bei.

Der Begriff Apoptose leitet sich vom griechischen Wort *απόπτωσις* ab, das das Herabfallen, z.B. der Blätter im Herbst, bezeichnet. Der Begriff wurde von Kerr et al. (1972) geprägt, die das Prinzip des programmierten Zelltods als Gegengewicht zur kontrollierten Zellteilung erkannten. Die erste morphologische Beschreibung war bereits 130 Jahre vorher publiziert worden (Vogt and Vogt 1842). Mikroskopisch lässt sich zunächst ein Schrumpfen der Zelle beobachten, gefolgt von der Fragmentierung des Zellkerns und Membranveränderungen, die zum Ausstülpfen und Abschnüren apoptotischer Vesikel (Zeiose) führen. Phagozytierende Zellen nehmen die Überreste apoptotischer Zellen *in vivo* innerhalb weniger Stunden auf, sodass die Freisetzung zytoplasmatischer Bestandteile verhindert wird (Savill et al. 1993).

Eine Vielzahl externer und interner Stimuli, wie z.B. ultraviolette (UV)- oder γ -Strahlung, Entzug von Wachstumsfaktoren, Chemotherapeutika oder die Stimulation soge-

nannter Todesrezeptoren sind in der Lage, Apoptose auszulösen. Ein sehr gut untersuchtes System ist das CD95-Rezeptorsystem (Peter and Krammer 2003). Durch Bindung von CD95-Ligand kommt es zur Trimerisierung des CD95-Rezeptors (Apo-1/Fas), und dadurch kann das Adaptermolekül FADD an den intrazellulären Teil des Rezeptors binden. FADD rekrutiert nachfolgend Procaspase-8 und der Tod-induzierenden Signalkomplexes (engl.: death-inducing signaling complex, DISC) wird gebildet. Die Aggregation von CD95 ermöglicht eine lokale Anhäufung von Caspasen. Die vorhandene intrinsische katalytische Aktivität führt zur proteolytischen Spaltung und Aktivierung von Caspase-8. Diese frühen apoptotischen Signale werden von den Initiatorcaspasen-8, -9 und -10 übermittelt, die nachfolgend die Effektorcaspasen-3, -6, und -7 aktivieren. Effektorcaspasen führen zur Spaltung der sogenannten Todessubstrate und dadurch zum Tod der Zelle (Lavrik et al. 2003). Dieser Weg wird auf Grund seiner Abhängigkeit von einer externen Stimulation der Todesrezeptoren als extrinsischer Apoptoseweg bezeichnet.

Dem gegenüber steht der intrinsische Apoptoseweg, der durch interne Stimuli ausgelöst wird. Dabei führen intrazelluläre Stress- und Schadenssensoren, wie zum Beispiel die Proteine Bim, Bax und Bak, zur Bildung von Poren in der inneren Mitochondrienmembran (Huang et al. 2000), wodurch Cytochrom c und weitere proapoptotische Moleküle aus den Mitochondrien in das Zytosol übertreten (Green and Reed 1998). Cytochrom c bildet dort mit dem Adaptormolekül Apaf-1 (engl.: apoptotic protease activating factor 1) und Procaspase-9 einen multimeren Komplex, der als Apoptosom bezeichnet wird (Zou et al. 1997; Adams and Cory 2002). Nachfolgend wird Procaspase-9 gespalten und aktiviert und führt wiederum zu einer Aktivierung der Effektorcaspasen. Durch anschließende Spaltung struktureller Bestandteile des Zellgerüsts kommt es dann zu mikroskopisch sichtbaren Veränderungen der Zellmembran und zur Bildung apoptotischer Vesikel (Janicke et al. 1998).

Im Gegensatz dazu stellt die Nekrose einen Caspase-unabhängigen Zelltod dar, der entsteht, wenn die Zelle physikalisch so stark geschädigt wird, dass ein Einleiten der Apoptose nicht mehr möglich ist. Dies ist z.B. der Fall, wenn durch Hitze oder Frosteinwirkung die Proteine der Zelle denaturieren oder Salze auskristallisieren. Auch durch starke UV-Strahlung kann dieser Zustand ausgelöst werden, wenn die DNA quervernetzt wird und die Transkription von Proteinen, die für die Apoptose benötigt werden, nicht mehr stattfinden kann.

Nekrose ist mikroskopisch betrachtet durch ein schnelles Anschwellen der Zelle und

nachfolgend durch den Verlust der Membranintegrität, der zu einem Ausschütten des Zellinhalts führt, gekennzeichnet. Dadurch werden Epitope für T-Zellen zugänglich, mit denen sie sonst nicht in Berührung kommen, da sie durch die Zellmembran geschützt sind. Zudem werden Substanzen freigesetzt, die als Gefahrensignale (Janeway 1992; Matzinger 1994) auf Zellen des Immunsystems wirken, unter anderem ATP, Harnsäure, Hitzeschockproteine und HMGB-1 (engl.: high mobility box binding protein 1) (Hanley et al. 2004; Shi et al. 2003; Binder et al. 2000; Scaffidi et al. 2002), das in der intakten Zellen an DNA bindet, bei der Nekrose jedoch auch ungebunden freigesetzt wird. HMGB-1 kann zu einer Aktivierung von DC, Macrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten durch Bindung an TLR 2 und 4 und RAGE (engl.: receptor for advanced glycation endproducts) führen. Nekrotische Zellen können auch zur Stimulation autoreaktiver T-Zellen führen, besonders da die intrazelluläre Epitope im Kontext einer Immunaktivierung erkannt werden. Da nekrotische Zellen auch sekundär aus apoptotischen Zellen entstehen können, die nicht schnell genug phagozytiert wurden (Wyllie et al. 1980), stellen sie eine Gefahr für die Aufrechterhaltung der Toleranz dar und dies kann zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen führen.

1.7 Die Rolle apoptotischer Zellen bei der Toleranzinduktion

Phagozytierende Zellen können apoptotische Zellen erkennen und aufnehmen (Franc 2002; Parnaik et al. 2000). Aber wie können sie sterbende von lebenden Zellen unterscheiden? Durch Forschungsergebnisse der letzten Jahre wurde deutlich, dass apoptotische Zellen aktiv an ihrer eigenen Aufnahme beteiligt sind (Lauber et al. 2003). Durch ein System an Signalen machen sie auf sich aufmerksam und initiieren ihre eigene Phagozytose. Lebende Zellen tragen Strukturen auf ihrer Membran, die sie vor einer Aufnahme schützen und die als „Don't-eat-me“-Signale bezeichnet werden. Zu ihnen gehören CD31 und CD47. CD31 interagiert mit nativ gefalteten CD31-Molekülen der Phagozyten und führt zu einer Abstoßung der Zellen (Brown et al. 2002). CD47 interagiert mit SIRP α (engl.: signal regulatory protein alpha), und diese Interaktion führt auch zu einer Abstoßung von lebender Zelle und Phagozyt. Apoptotische Zellen verlieren oder modifizieren diese Signale, sodass es zur Bindung der Zellen durch Phagozyten kommt (Brown et al. 2002; Gardai et al. 2005). Zusätzlich wird ihre Aufnahme durch die Präsentation von so genannten „Eat-me“-Signalen positiv beeinflusst (Übersicht in

Fadok et al. 1992). Außerdem sezernieren sie Moleküle, die Phagozyten anlocken und dadurch die Aufnahme beschleunigen. Diese werden als „Find-me“-Signale bezeichnet, zu denen z.B. Lysophosphatidylcholin gehört (Lauber et al. 2003).

Die Systeme zur Aufnahme apoptotischer Zellen weisen eine hohe Redundanz auf. Das spiegelt sich in der Beobachtung wider, dass Antikörper gegen einzelne Komponenten die Phagozytose nur teilweise blockieren (Verbovetski et al. 2002; Devitt et al. 1998; Moffatt et al. 1999; Chang et al. 1999; Ogden et al. 2001). Allerdings hat sich im Maussystem gezeigt, dass schon das Fehlen eines einzelnen Moleküls die Phagozytose erheblich vermindern und zu Autoimmunerkrankungen führen kann. Dies wurde für die Moleküle MerTK (Mer-Tyrosin-Kinase), MFG-E8 (engl.: milk fat globular protein E8), C1q (engl.: complement component 1 subcomponent q), CD14 und MBL (Mannosebindendes Lektin) nachgewiesen (Cohen et al. 2002; Hanayama et al. 2004; Sen et al. 2007).

Die Phagozytose apoptotischer Zellen führt in der Regel nicht zu einer Aktivierung von Makrophagen und DC. Im Gegenteil lässt sich sogar beobachten, dass nach einer späteren Stimulation mit LPS die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF, IL-12 und IL-6 vermindert und die Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine wie TGF β und IL-10 erhöht ist (Voll et al. 1997; Kim et al. 2004; Byrne and Reen 2002; Fadok et al. 1998). Dies geht mit einer verminderten Expression kostimulatorischer B7-Moleküle einher (Ip and Lau 2004; Stuart et al. 2002). Außerdem wurde gezeigt, dass sterbende Lymphozyten IL-10 und apoptotische Thymozyten TGF β sezernieren (Gao et al. 1998; Chen et al. 2001). Das anti-inflammatorische Zytokinmilieu ist offensichtlich notwendig für die Toleranzinduktion in Phagozyten, scheint aber allein nicht ausreichend zu sein, da die Inhibition durch Zellkontakt mit der apoptotischen Zelle erfolgt und nicht von löslichen Faktoren abhängt (Cvetanovic and Ucker 2004; Weyd 2006).

1.8 Annexin 1 als anti-inflammatorisches Molekül

Die Familie der Annexine stellt eine Gruppe von evolutionär konservierten Kalzium- und Lipid-bindenden Proteinen dar. Ihre Vertreter finden sich in Wirbeltieren, Pflanzen, Pilzen und Protisten, jedoch nicht in Hefen und Prokaryoten (Benz and Hofmann 1997; Morgan and Fernandez 1997). Bislang sind über 160 Annexine bekannt, die in

mehr als 65 Spezies vorkommen.

In Wirbeltieren sind zwölf Annexine beschrieben worden, die wahrscheinlich durch Genduplikationen entstanden sind. Jedoch sind nicht alle Vertreter in allen Geweben vorhanden. Die gewebespezifische Expression wird auch als Annexin-Fingerabdruck bezeichnet (Gerke and Moss 2002).

Strukturell weisen Annexine einen hochkonservierten C-terminalen Kern und einen für das jeweilige Familienmitglied spezifischen N-Terminus auf (Übersicht in Gerke and Moss 2002). Der Kern enthält kalziumbindende Domänen, mit denen das Molekül nach seiner Externalisierung über eine Interaktion mit Phosphatidylserin-gebundenem Kalzium an die Oberfläche der Zelle binden kann. Diese Externalisierung wurde bei Annexin 1, 2, 4 und 5 unter anderem im Rahmen früher apoptotischer Ereignisse beobachtet (Weyd 2006; Gerke and Moss 2002). Der Mechanismus der Translokation ist ungeklärt. Weiterhin ist unklar, ob es sich um ein aktives oder passives Ereignis handelt. Generell wurden für die Annexine mehrheitlich intrazelluläre Funktionen beschrieben, z.B. wird ihnen eine Rolle bei der Aggregation von Membranen, bei der Organisation von Membranstrukturen und beim Vesikeltransport zugeschrieben.

Allgemein ist die Funktion der Annexine unzureichend untersucht, jedoch lässt sich darüber spekulieren, dass diese Proteinfamilie grundlegende Aufgaben übernimmt. Dafür spricht ihre starke evolutionäre Konservierung. Zudem kann man annehmen, dass die Familienmitglieder eine gewisse funktionale Redundanz aufweisen, da *knock-out*-Mäuse für die Annexine 5, 6 und 7 keinen starken Phänotyp zeigen (Brachvogel et al. 2003; Hawkins et al. 1999; Herr et al. 2001).

Wie alle Annexine kann Annexin 1 strukturell und funktionell in den lipid- und kalziumbindenden Kern und den spezifischen N-Terminus unterteilt werden. Der N-Terminus besteht aus 40 Aminosäuren und bildet in Abwesenheit von Kalzium eine α -Helix, die in die Kerndomäne inseriert (Rosengarth et al. 2001). In Anwesenheit von Kalzium wird der N-Terminus freigegeben und steht für Interaktionen mit anderen Molekülen zur Verfügung. Der N-Terminus ist sehr anfällig für proteolytische Spaltung. Dies kann z.B. spontan, nach Stimulation mit Phorbolestern oder im Verlauf der Apoptose geschehen (Liu et al. 1995; Debret et al. 2003). Möglicherweise spielt hierbei eine membranständige Metalloprotease eine Rolle (Movitz and Dahlgren 2000). Die funktionelle Bedeutung der Abspaltung des N-Terminus ist unklar.

Eine konstitutive Expression von Annexin 1 findet sich vor allem in Zellen des Immunsystems, im Nervensystem und in verschiedenen Epithelien (Morand et al. 1995; Dreier

et al. 1998). Bei neutrophilen Granulozyten kann Annexin 1 1-4 % der zytosolischen Proteine ausmachen. T-Zellen, Makrophagen, NK-Zellen und DC besitzen ebenfalls eine hohe Annexin 1-Expression, während das Protein in B-Zellen und Erythrozyten nicht oder nur in geringem Maße nachweisbar ist. In anderen Geweben beobachtete man eine differenzierungs- oder stressabhängige Induktion. In der Leber kann Annexin 1 zum Beispiel in der Embryonalentwicklung und während der Regeneration nachgewiesen werden (Della Gaspera et al. 2001; Masaki et al. 1994).

Annexin 1 wurde seit seiner Entdeckung mit anti-inflammatorischen Effekten in Verbindung gebracht. Dabei werden der N-Terminus und eine als Antiflammin bezeichnete Sequenz im Kernbereich als aktive Domänen diskutiert (Miele 2000). Glukokortikoide, die therapeutisch zur Entzündungshemmung eingesetzt werden, tragen *in vitro* und *in vivo* zu einer erhöhten Expression von Annexin 1 bei (Solito et al. 1994; Castro-Caldas et al. 2002). Im Zusammenhang mit Glukokortikoiden wurde auch eine Externalisierung von Annexin 1 an die Zelloberfläche beschrieben (Castro-Caldas et al. 2002). Die anti-inflammatorischen Eigenschaften von Annexin 1 beruhen zum Teil auf Inhibition der Phospholipase A2 (Wallner et al. 1986). Neueren Erkenntnissen zu Folge handelt es sich wahrscheinlich um eine unspezifische Hemmung, da Annexin 1 durch seine Bindung an negativ geladene Phospholipide die Substrate der Enzyme maskiert (Bastian et al. 1993; Raynal et al. 1993).

Die glukokortikoid-assoziierten Wirkungen wurden auch in der Annexin 1 *knock-out*-Maus bestätigt. Diese zeigt eine verminderte anti-inflammatorische Reaktion auf Glukokortikoide (Hannon et al. 2003). Perretti et al. (1993) und Duncan et al. (1993) bestätigten diese Ergebnisse, indem sie in mehreren Entzündungsmodellen die Wirkung von Glukokortikoiden durch die Injektion von Antikörpern gegen Annexin 1 aufheben konnten. Im Allgemeinen lässt sich eine erhöhte Sensitivität der Annexin 1-*knock-out*-Maus gegenüber Entzündungen feststellen (Hannon et al. 2003; Roviezzo et al. 2002; Yang et al. 2004). Des Weiteren ist die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Lymphozyten gestört, und polymorphkernige Granulozyten zeigen eine vermehrte spontane Einwanderung ins Gewebe. Dieser Effekt wurde bereits von Getting et al. (1997) beschrieben, die nachweisen konnten, dass extrazelluläres Annexin 1 auf neutrophilen Granulozyten die Adhäsion an aktiviertes Endothel und damit die Extravasation in entzündetes Gewebe vermindert. Mechanistisch kann die Adhäsion zum einen durch das Abwerfen (engl.: shedding) von L-Selektin-Molekülen von der Oberfläche von neutrophilen Granulozyten, zum anderen über eine Interaktion mit dem Formylpeptidre-

zeptor (FPR) oder dem verwandten Protein FPRL1 (Formylpeptidrezeptor Ligand 1) auf Endothelzellen verringert werden (Walther et al. 2000; Perretti et al. 2001; Gavins et al. 2003).

Annexin 1 hat auch einen Effekt auf Monozyten und Makrophagen, indem es die Migration von Monozyten hemmt (Getting et al. 1997) und die Stickstoffmonoxid-Produktion der murinen Makrophagen-Zelllinie J774 *in vitro* nach Stimulation mit LPS reduziert (Ferlazzo et al. 2003). Zudem wird von einer weitergehenden tolerogenen Wirkung ausgegangen. In unserer Arbeitsgruppe konnte nachgewiesen werden, dass Annexin 1 die TNF-Sekretion von primären DC nach Stimulation mit LPS hemmt. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich für die monozytische Zelllinie U937, die sich zu Zellen mit DC-Eigenschaften differenzieren lässt. Apoptotische Zellen üben denselben Effekt aus, und es konnte nachgewiesen werden, dass Annexin 1 in einem frühen Stadium der Apoptose externalisiert wird und an Phosphatidylserin (PS) auf der Oberfläche bindet. Mit Antikörpern gegen Annexin 1 kann der Effekt teilweise aufgehoben werden (Weyd 2006; Dörner 2007). Eine Rolle als „Eat-me“-Signal bei der Phagozytose, wie von Arur et al. (2003) beschrieben, konnte in unserem Labor nicht bestätigt werden. Annexin 1 stellt somit einen vielversprechenden Kandidaten für die Toleranzvermittlung durch apoptotische Zellen dar.

1.9 Systemischer Lupus Erythematoses (SLE)

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine heterogene humane Autoimmunerkrankung, über deren Ätiologie und Pathogenese noch wenig bekannt ist. Die ersten Beschreibungen von Symptomen dieser Erkrankung datieren wahrscheinlich zurück ins Mittelalter, unter anderem erwähnt Rogerius, ein berühmter Chirurg des 12. Jahrhunderts, erstmals 1230 die charakteristischen rötlichen Hautläsionen in seinen Aufzeichnungen (Hepburn 2001). Der Name der Krankheit wurde jedoch durch Cazénave (1851) geprägt, der die Bezeichnung „lupus érythémateux“ verwendete, um die verschiedenen Formen des Lupus erythematoses von der kutanen Tuberkulose (Lupus vulgaris) abzugrenzen (Kuhn and Beissert 2005). Die Bezeichnung leitet sich von lat.: *lupus* = „Wolf“ und griech.: *ερύθημα* = „Röte“ ab und beschreibt die typischen Hautläsionen („Schmetterlingserythem“), die angeblich Wolfbissen ähneln sollen. Kaposi beschrieb 1872 den Lupus erythematoses als eine Erkrankung, die auch systemische Organe be-

fallen kann (Isenberg et al. 2008).

Mit einer Inzidenz von 2,0 bis 7,6 Fällen von 100.000 Personen pro Jahr und einer Prävalenz von 17 bis 48 von 100.000 Personen gehört der SLE, zumindest in Deutschland, zu den seltenen Erkrankungen (Tebbe and Orfanos 1997). Frauen sind häufiger betroffen als Männer, es wird ein Verhältnis zwischen Frauen und Männern von neun zu eins beschrieben (Kuhn and Beissert 2005; Masi and Kaslow 1978). Das hormonelle Milieu spielt in der Pathogenese des SLE wahrscheinlich eine Rolle, da Neuerkrankungen häufig im Zuge der pubertären Hormonumstellung auftreten und nach der Menopause selten sind (Wilder 1998; Costenbader et al. 2007). Berghofer et al. (2006) konnten im Gegensatz dazu zeigen, dass die Produktion von Interferon alpha ($\text{IFN}\alpha$) bei Frauen nach Stimulation von TLR 7 doppelt so hoch ist wie bei männlichen Kontrollen, und dass diese Beobachtung nicht im Zusammenhang mit Östrogenen oder einer schlechten Kontrolle des stillgelegten zweiten X-Chromosoms steht.

Um der Heterogenität des SLE gerecht zu werden (Abb. 3) und trotzdem eine weitgehend gesicherte Diagnose zu ermöglichen, wurden die elf Kriterien der amerikanischen Gesellschaft für Rheumatologie (engl.: American College of Rheumatology, ACR) 1982 entwickelt und 1997 modifiziert (Tan et al. 1982; Hochberg 1997). Mindestens vier der folgenden Kriterien müssen gleichzeitig oder sequentiell erfüllt sein, um die Diagnose eines SLE als bestätigt anzusehen:

Tabelle 1: Die 11 Kriterien zur Klassifikation des SLE von dem amerikanischen College für Rheumatologie (ACR), 1982 herausgegeben.

Kriterium/Beschreibung
1. Schmetterlingserythem
2. Diskoide Hautläsionen
3. Photosensitivität
4. Orale Ulzera
5. Nicht deformierende Arthritis
6. Serositis
7. Funktionsstörung der Niere
Persistierend mehr als 0,5 g Eiweiß pro Tag im Urin oder krankhafte Harnsedimente wie Blutreste oder Harnzylinder
8. Funktionsstörung des Zentralnervensystems
9. Hämatologische Symptome

Hämolytische Anämie mit Retikulozytose, Leukopenie (weniger als 4.000 Leukozyten pro mm bei mindestens zwei Messungen), Lymphopenie (weniger als 1.500 Lymphozyten pro mm bei mindestens zwei Messungen), Thrombozytopenie (weniger als 100.000 Thrombozyten pro mm in Abwesenheit von beeinflussenden Medikamenten)

10. Immunologische Funktionsstörungen

Anti-dsDNA Antikörper gegen native DNA gerichtet, anti-Sm Antikörper, anti-Phospholipid Antikörper (positive Reaktion an mindestens zwei Messungen, die mindestens sechs Wochen auseinander liegen), erhöhte IgG- oder stark erhöhte IgM-anti-Cardiolipin Antikörper, Lupus-Antikoagulans Antikörper oder positiver serologischer Test auf Syphilis (VDRL-Test, engl.: Venereal Disease Research Laboratory Test)

11. Autoantikörper gegen Zellkernbestandteile

Erhöhte Titer von ANA (engl.: antinuclear antibodies = ANA) nachgewiesen durch Immunfluoreszenz oder äquivalente Tests zu jedem beliebigen Zeitpunkt in Abwesenheit von Medikamenten, die für eine Assoziation mit Medikamenten-induziertem Lupus erythematoses bekannt sind

SLE ist eine Erkrankung, bei der die Symptome oft in Schüben auftreten und die lebensbedrohlich verlaufen kann. Nicht selten kann es zur Zerstörung lebenswichtiger Organe wie z.B. der Nieren im Laufe einer Krankheitsgeschichte kommen. Um den Aktivitätsstatus der Erkrankung zu bestimmen, bedient man sich unterschiedlicher Bewertungssysteme. Es werden z.B. der „SLE disease activity index“ (SLEDAI), der „Systemic Lupus Activity Measure“ - Index (SLAM), der „British Isles Lupus Assessment Group“-Index (BILAG) und der „European Consensus Lupus Activity Measurement“-Index (ECLAM) verwendet (Bencivelli et al. 1992; Vitali et al. 1992; Gladman et al. 1992). Die einzelnen Bewertungssysteme unterscheiden sich in den evaluierten Parametern, korrelieren aber bezüglich der ermittelten Aktivität des SLE miteinander (Aringer and Smolen 2006). Mit dem ECLAM werden 17 klinische Parameter und 8 Laborparameter erfasst, wobei sich die Laborparameter in 6 organbezogene und 2 aktivitätsbezogene unterteilen (Aringer and Smolen 2006). Dieser Index eignet sich am besten, um die Aktivität des SLE retrospektiv zu beurteilen. Mit dem SLEDAI werden insgesamt 15 klinische Parameter, sowie 5 organbezogene und 2 aktivitätsbezogene Laborparameter evaluiert. Dieser Bewertungsindex wurde bereits in vielen Studien zur

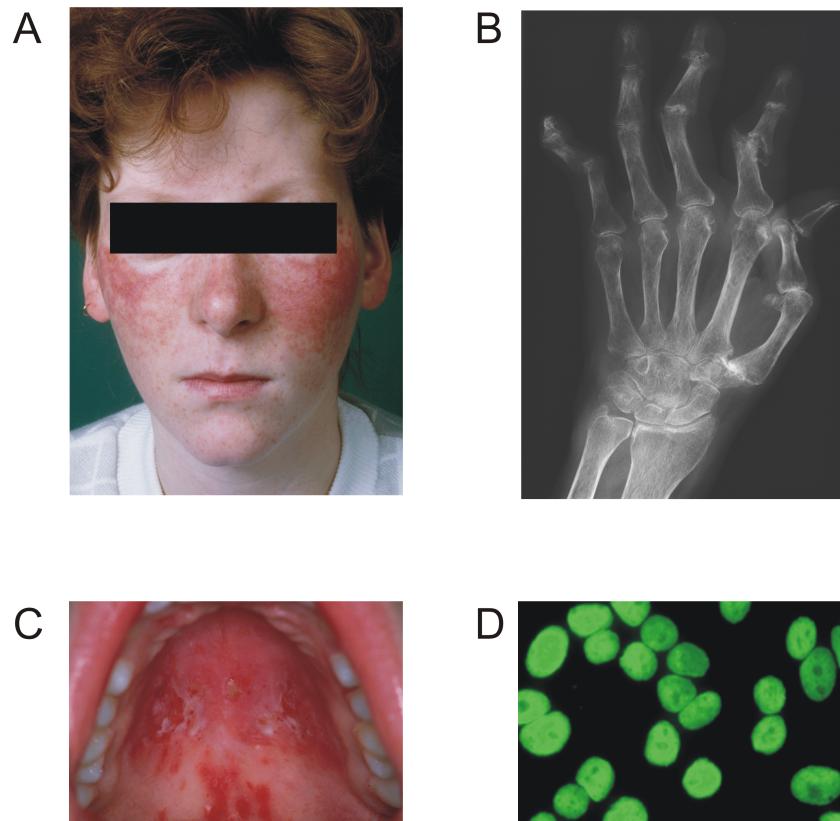


Abbildung 3: Krankheitsmerkmale des SLE. (A) Schmetterlingserythem, (B) Arthritis (Röntgenaufnahme einer Hand), (C) Orale Ulzera und (D) ANA (Antikörper aus dem Serum von Patienten mit SLE binden an Zellkerne und wurden mit einem fluoreszierenden Antikörper gegen humanes IgG sichtbar gemacht). Quellen: (A) und (C) (Kuhn et al. 2007) Aufnahmen wurden von der Hautklinik Münster freundlicherweise zur Verfügung gestellt, (B) Aufnahme wurden von PD Dr. Becker und der Radiologie der Universitätsklinik Münster freundlicherweise zur Verfügung gestellt, (D) eigene Aufnahmen Prof. Dr. Kuhn, Münster.

Analyse von Treg bei Patienten mit SLE verwendet und auf Grund der besseren Vergleichbarkeit mit diesen Studien auch in diese Arbeit einbezogen.

Einzelne Merkmale wie das Auftreten von Autoantikörpern spielen eine große Rolle in der Pathogenese der SLE, da sie schon häufig Jahre vor der klinischen Manifestation nachweisbar sein können und ihr Titer mit dem Aktivitätsstatus der Erkrankung korrelieren kann. Dies gilt insbesondere für Autoantikörper gegen doppelsträngige DNA (anti-dsDNA Antikörper), deren Titer oft mit der Aktivität der Krankheit ansteigt. Auch kann die Anwesenheit solcher Antikörper mit einer Beteiligung bestimmter Organe wie z.B. den Nieren korrelieren (Riboldi et al. 2005; Weitzman and Walker 1977). Das sehr heterogene Krankheitsbild und die systemischen Entzündungsreaktionen erschweren jedoch die Untersuchung der Pathogenese des SLE teilweise erheblich, so dass wenige Ursachen dieser Krankheit bis heute definiert werden konnten. Auch ist zu

erwähnen, dass primäre krankheitsauslösende Zustände häufig von sekundären Symptomen, die sich im Verlauf der Erkrankung ausbilden können, schwierig zu unterscheiden sind.

Mit Hilfe von *in vitro*- und *ex vivo*-Experimenten ist versucht worden, die immunologischen Veränderungen von Patienten mit SLE folgendermaßen zu erklären: Bei Patienten mit SLE sind die B-Zellen hyperreaktiv (Tanaka et al. 1988; Folzenlogen et al. 1997; Grammer et al. 2004), und die Anzahl aktivierter B-Zellen ist erhöht; demzufolge kommt es zur Bildung von zirkulierenden IgM- und IgG-Antikörpern (Klinman et al. 1991). Weiterhin ist die Signaltransduktion des B-Zell-Rezeptors gestört (Liossis et al. 1996), und die Zellen sind anfälliger für eine unspezifische polyklonale Aktivierung (Mok et al. 2004). Erhöhte IL-6- und IL-10-Konzentrationen im Serum begünstigen einen Wechsel der Antikörperklasse von IgM zu IgG und die Differenzierung der B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen (Linker-Israeli et al. 1991; Monneaux and Muller 2002; Mok et al. 2004; Rousset et al. 1995; Tyrrell-Price et al. 2001; Fairhurst et al. 2006). Zusätzlich ist die Anzahl der aktivierten T-Zellen im Blut erhöht, jedoch produzieren die Zellen wenig IL-2 (Landry 1977; Alcocer-Varela and Alarcon-Segovia 1982). Weiterhin differenzieren die CD4+ T-Zellen vornehmlich zu Th2-Zellen, die die B-Zell-Hilfe und den Wechsel der Antikörperklasse zu IgG begünstigen (Linker-Israeli et al. 1991).

Eine der häufigst genannten Hypothesen zur Pathogenese des SLE besagt, dass neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen eine reduzierte Phagozytose apoptotischer Zellen aufweisen, die in geringerem Maße von Komplement vermittelt und von Fc-Rezeptoren verstärkt wird (Landry 1977; Bijl et al. 2006; Shoshan et al. 2001; Salmon et al. 1984). Weiterhin sind DC, die apoptotisches Material aufgenommen haben, im Vergleich zu DC von gesunden Kontrollen in der Lage, T-Zellen zu aktivieren (Blanco et al. 2001). Im Immunsystem eines Patienten mit SLE werden plasmazytoide DC aktiviert und sezernieren als Folge IFN α (Lovgren et al. 2004; Blanco et al. 2001). Daneben sind ebenfalls die Serum-Spiegel der Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-15, IL-16 und IL-18 erhöht (Mok and Lau 2003; Fairhurst et al. 2006). Zusätzlich enthält das Serum große Mengen Antikörper, z.B. gegen nukleäre Antigene, doppelsträngige DNA, Komponenten des endoplasmatischen Retikulums, C1q, Phospholipide und Annexin 1 (Tan et al. 1997; Tan and Kunkel 2006; Harris 1990; Casciola-Rosen et al. 1994; Goulding et al. 1989). Auf Grund dieser Veränderungen ist das Serum von Patienten mit SLE in der Lage, die Differenzierung von Monozyten zu DC zu induzieren (Blanco et al.

2001).

Aus diesen Beobachtungen lässt sich die folgende hypothetische Pathogenese des SLE herleiten: Im Gewebe treten vermehrt apoptotische Zellen auf, da entweder mehr Zellen sterben oder die apoptotischen Zellen weniger effizient von umliegenden Zellen oder professionellen Phagozyten aufgenommen werden. Die Aufnahme verzögert sich, die Zellen verlieren ihre Membranintegrität, intrazelluläre Gefahrensignale werden ins umliegende Gewebe abgegeben. Phagozyten nehmen apoptotisches Material in diesem Kontext auf und werden aktiviert. Nachfolgend sezernieren Makrophagen und DC pro-inflammatorische Zytokine und exprimieren kostimulatorische Moleküle für die Interaktion mit T-Zellen. Danach wird die Reifung der DC eingeleitet und nicht wie im Normalzustand unterdrückt. Daraufhin wandern die DC in den Lymphknoten und aktivieren autoreaktive CD4⁺ T-Zellen. Die T-Zellen aktivieren nachfolgend autoreaktive B-Zellen und induzieren einen Wechsel der Antikörperklasse. Diese autoreaktiven B-Zellen produzieren IgM- sowie IgG-Antikörper gegen körpereigene Antigene aus den apoptotischen Zellen.

Falls erneut vermehrt apoptotische Zellen auftreten, setzt eine positive Rückkopplung ein, die auf Dauer zur klinischen Manifestation einer Autoimmunerkrankung führt. Die autoreaktiven Antikörper erkennen Epitope auf der Oberfläche der apoptotischen Zellen oder im Inneren der sekundär nekrotischen Zellen. Es kommt zu einer vermehrten Aufnahme über Fc-Rezeptoren, die zusätzlich durch eine geringe Konzentration an Komplementproteinen begünstigt wird. Die Aufnahme über Fc-Rezeptoren ist mit der Opsonisierung eines Pathogens assoziiert und bewirkt eine Aktivierung des Phagozyten (Kavai and Szegedi 2007). Weiteres apoptotisches Material wird im Lymphknoten präsentiert und führt potenziell zur Aktivierung weiterer autoreaktiver B-Zellen und der Produktion weiterer autoreaktiver Antikörper. Die Antikörper bilden mit ihren Antigenen Immunkomplexe, die von den Phagozyten in nicht ausreichendem Maße entsorgt werden und zu entzündlichen Ablagerungen in verschiedenen Organen, wie z.B. den Nieren, führen. Die chronische Aktivierung des Immunsystems führt im Extremfall zur Zerstörung des Organs.

Das oben beschriebene Modell legt nahe, dass mehrere Kontrollstellen der peripheren Toleranz ausgeschaltet sind, die bei unterschiedlichen Patienten verschieden sein können. ANA sind bei fast 5 % der älteren Bevölkerung nachweisbar, ohne dass dieser Befund mit einem starken Risiko für eine Autoimmunerkrankung verbunden ist (Ruffatti et al. 1990). Es müssen also weitere Faktoren hinzukommen, um das Immunsystem

zu beeinflussen, eigenes Gewebe anzugreifen. Eine Möglichkeit ist eine weitreichende Störung der Aufnahme apoptotischer Zellen. Menschen mit einer C1q-Defizienz, denen somit das erste Protein der Komplementkaskade fehlt, entwickeln mit einer Penetranz von 95 % SLE (Petry 1998).

Darüber hinaus besitzt SLE eine genetische Komponente. Mehrere Chromosomenabschnitte werden mit einem erhöhten Risiko, an SLE zu erkranken, in Verbindung gebracht. Der Zwilling eines Patienten erkrankt mit 25-50 % Wahrscheinlichkeit auch an einem SLE (Fairhurst et al. 2006; Mok et al. 2004), sodass davon ausgegangen werden kann, dass einige der beobachteten zellulären Defekte auf genetische Prädisposition zurückzuführen sind, während andere Unregelmäßigkeiten durch Umwelteinflüsse wie Infektionen oder Allergene zu erklären sind.

Apoptotische Zellen können nach der aufgezeigten Hypothese die Hauptquelle für Autoantigene in Patienten mit SLE darstellen. Die Aufnahme dieser Zellen würde in Patienten mit SLE statt zu einer immunologisch unauffälligen oder vorteilhaften Entsorgung zu einer Entzündungsreaktion gegenüber apoptotischen Antigenen führen, wodurch die periphere Toleranz gegen diese Antigene aufgehoben würde (Casciola-Rosen et al. 1994; Rosen and Casciola-Rosen 1999; Voll et al. 1997). Die Untersuchung der Zellen von Patienten mit SLE kann daher möglicherweise Aufschluss darüber geben, wie bei gesunden Menschen die Toleranz gegenüber apoptotischem Material aufrechterhalten wird. Besondere Beachtung verdient in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass einige Patienten mit SLE Antikörper gegen Moleküle aufweisen, die bei der Interaktion von Phagozyt und apoptotischer Zelle eine Rolle spielen, wie zum Beispiel C1q, Phospholipide und Annexin 1.

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Die Interaktion von apoptotischen Zellen und DC spielt eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz. Ist diese gestört, so kann es zu Autoimmunreaktionen kommen. Es wurde beschrieben, dass sich vermehrt apoptotische Zellen im Blut von Patienten mit SLE finden. ANA und anti-dsDNA Antikörper sind bei der Mehrheit der Patienten eine phänotypische Ausprägung der Krankheit. Da diese Strukturen normalerweise nur beim Absterben von Zellen zugänglich werden, könnte im SLE ein Defekt auf Seiten der apoptotischen Zelle oder der phagozytierenden DC

vorliegen.

Ziel der Arbeit war es, das Apoptoseverhalten von neutrophilen Granulozyten aus dem peripheren Blut von Patienten mit SLE im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen zu charakterisieren. An Hand eines *in vitro*-Systems sollte die suppressive Wirkung auf U937, eine monozytische Zelllinie mit DC ähnlichen Eigenschaften, analysiert werden. Des Weiteren sollten DC aus monozytischen Vorläuferzellen in beiden Gruppen auf ihre Stimulierbarkeit und Supprimierbarkeit mit apoptotischen Zellen untersucht werden. Ein besonderes Augenmerk sollte auf dem Einfluss von Annexin 1 in diesen Systemen gelegt werden. Daneben sollten Treg quantifiziert und charakterisiert werden, um einen Einblick in die Regulationsmechanismen auf Seiten der T-Zellen zu bekommen. Auf diese Weise sollten unterschiedliche Aspekte analysiert werden, die Rückschlüsse auf die *in vivo* Mechanismen der peripheren Toleranz beim SLE zulassen könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten- und Kontrollkollektiv

Im Zeitraum von Juni 2006 bis August 2008 wurden in Frage kommende Patienten aus der Abteilung Rheumatologie der Medizinischen Klinik V der Universitätsklinik Heidelberg (Leiter: Prof. Dr. Hanns-Martin Lorenz) und der Abteilung Rheumatologie der Kerkhoff-Klinik Bad Nauheim (Direktor: Prof. Dr. Ulf Müller-Ladner), sowie der Abteilung Nephrologie der I. Medizinischen Klinik der Universitätsklinik Mainz (Direktor: Prof. Dr. Andreas Schwarting) auf eine Teilnahme an der Studie angesprochen. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Heidelberg bewilligt (Ethikantrag 202/2005) und gemäß des Helsinki-Abkommens durchgeführt. Alle Patienten und Kontrollpersonen, denen Blut abgenommen wurden, erteilten schriftlich ihr Einverständnis zur freiwilligen Teilnahme an der Studie.

Das wichtigste Einschlusskriterium für die Auswahl der Patienten für alle Studien war die gesicherte Diagnose eines SLE, d.h. die Erfüllung von mindestens 4 der ACR-Kriterien. In dieser Studie wurden der ECLAM und der SLEDAI verwendet, um die Patienten aus unterschiedlichen Kliniken miteinander vergleichen zu können. Für die Untersuchung zum Einfluss von Apoptose auf die periphere Toleranz wurden insgesamt 19 Patienten mit SLE und 19 gesunde Kontrollpersonen eingeschlossen. Der ECLAM wurde als Maß für die Aktivität der Krankheit verwendet, da er eine hohe Akzeptanz in Europa genießt und auch retrospektiv erhoben werden kann. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurden zusätzlich sechs SLE Patienten an zwei unabhängigen Terminen und bei einem Patienten an drei unabhängigen Terminen analysiert. Als gesunde Kontrollen wurden nach Möglichkeit Spender mit gleichem Alter und Geschlecht verwendet, um die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten.

Das durchschnittliche Alter der Patienten mit SLE betrug $39,1 \pm 13,6$ Jahre (17 weiblich, 2 männlich) und bei den Kontrollpersonen $30,1 \pm 8$ Jahre (17 weiblich, 2 männlich). Die demographischen und klinischen Daten finden sich in Tabelle 1, aus datenschutzrechtlichen Gründen wurden die Namen durch Nummern ersetzt.

Tabelle 2: Demographische und klinische Daten der Patienten mit SLE, die in Apoptose- und Suppressionsexperimente eingeschlossen wurden.

No.	Alter	m/w	Serologie	Therapie	ECLAM
1	33	w	ANA, dsDNA	AM	5
2	21	m	ANA, dsDNA	IS, CS _m	2
3	39	w	ANA, dsDNA	-	1
4	18	w	ANA, dsDNA, Ro/SSA, La/SSB	IS, CS _m	3
5	74	w	ANA, dsDNA, Ro/SSA	IS, CS _n	3
6	58	w	ANA, dsDNA	IS, CS _n	1
7	62	w	ANA, RNP	AM, CS _n	3
8	42	w	ANA, dsDNA, Ro/SSA	IS, CS _n	2
9	39	w	ANA, dsDNA, ACA, La/SSB	IS, AM, CS _n	3,5
10	35	w	ANA, dsDNA	AM, CS _n	2,5
11	43	m	ANA, dsDNA, RNP	IS, CS _m	1
12	27	w	ANA, dsDNA, Ro/SSA, La/SSB	IS, AM	0
13	37	w	ANA, dsDNA, Scl 70	-	1
14	42	w	ANA, dsDNA	IS, CS _n	3
15	45	w	-	IS	2
16	32	w	ANA, dsDNA	AM, CS _n	0,5
17	30	w	ANA, dsDNA	CS _h	2
18	24	w	ANA, dsDNA	AM, CD _n	1,5
19	42	w	ANA	AM, CS _n	0

ANA: antinukleäre Antikörper; dsDNA: anti-doppelsträngige DNA Antikörper; ACA: anti-Cardiolipin Antikörper; AM: Antimalariamittel; CS: Glucocorticosteroide (n = niedrig: < 10 mg/Tag, m = medium: 10-20 mg/Tag, h = hoch > 20 mg/Tag); IS: Immunsuppressiva

Für die Untersuchungen zur Charakterisierung von Treg beim SLE wurden 20 Patienten und 20 gesunde Kontrollen eingeschlossen. Um die Vergleichbarkeit mit anderen Studien zu gewährleisten, wurde der SLEDAI als Aktivitätsindex verwendet. Die Patienten wurden nach SLEDAI in die Gruppe mit passiver Erkrankung (SLEDAI ≤ 4 ; 12 Patienten) bzw. mit aktiver Erkrankung (SLEDAI > 4 ; 8 Patienten) eingeteilt. Das durchschnittliche Alter der Patienten mit SLE betrug $41,9 \pm 12,9$ Jahre (18 weiblich, 2 männlich) und das der gesunden Kontrollen lag bei $39,6 \pm 13,2$ Jahre (8 weiblich, 12 männlich). Die demographischen und klinischen Daten finden sich in Tabelle 2.

Tabelle 3: Demographische und klinische Daten der Patienten mit SLE, die in Treg-Experimente eingeschlossen wurden.

No.	Alter	m/w	Serologie	Therapie	SLEDAI
1	52	w	ANA, dsDNA, Ro/SS-A, RNP	medium CS, IS	2
2	33	w	ANA, dsDNA, ACA	CS _n , AM	0
3	33	w	ANA, dsDNA	CS _n , IS, AM	0
4	44	w	ANA; dsDNA	-	4
5	43	w	ANA, dsDNA, ACA	AM	2
6	41	m	ANA, dsDNA, nRNP, CL	CS _h , IS	1
7	25	w	ANA, dsDNA, H, Scl-70, CL	CS _n , IS, NSAR	9
8	26	w	ANA*, dsDNA, ACA, LA	CS _n , IS	4
9	34	w	ANA, dsDNA	CS _m , IS	4
10	46	w	ANA, dsDNA*	CS _n , IS	0
11	73	w	ANA, dsDNA, Ro/SS-A, La/SS-B	CS _n	8
12	41	w	ANA, dsDNA*, SM, nRNP	CS _n , IS, AM	2
13	69	w	ANA, dsDNA, ACA, LA, low C3	-	16
14	20	w	ANA, dsDNA, N, H	CS _n , IS, AM	2
15	44	m	ANA, dsDNA, low C4	CS _m , IS	18
16	38	w	ANA, dsDNA, Scl-70	CS _m , AM	4
17	40	w	ANA, dsDNA, La/SS-B, CL, low C3	CS _n , IS	7
18	25	w	ANA, dsDNA, N, low C3	CS _n , AM	5
19	57	w	ANA, dsDNA, N	CS _m , IS, NSAR	15
20	65	w	ANA, dsDNA, N	CS _n	8

*positiv in früheren Tests; ANA: antinukleäre Antikörper; ANCA: anti-Neutrophilen Zytoplasma Antikörper; ACA: anti-Cardiolipin Antikörper; dsDNA: anti-doppelsträngige DNA Antikörper; H: anti-Histon Antikörper; LA: Lupus Anticoagulant; La/SS-B: anti-La/SS-B Antikörper; N: anti-Nucleosomen Antikörper; Ro/SS-A: anti-Ro/SS-A Antikörper; AM: Antimalariamittel; CS: Glucocorticosteroide (n = niedrig: < 10 mg/Tag, m = medium: 10-20 mg/Tag, h = hoch > 20 mg/Tag); IS: Immunsuppressiva (Azathioprin, Cyclosporin A, Cyclophosphamid, Methotrexat, Mycophenolat Mofetil), NSAID: nicht steroidale anti-entzündliche Medikamente (engl.: non-steroidal anti-inflammatory drugs)

Für die Untersuchungen zum Nachweis von Antikörpern gegen Annexin 1 im Serum wurden Seren von 42 Patienten mit SLE (37 weiblich, 5 männlich, Alter: 41,7±13,0; 18 Patienten entsprechen den Patienten in Tabelle 1), 65 Patienten mit CLE (46 weiblich, 19 männlich, Alter: 49,9±14,8) und 56 gesunde Kontrollen (33 weiblich, 23 männlich, Alter: 29,9±9,2) verwendet.

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Serva (Heidelberg), Fluka (NeuUlm), Sigma (München), Roth (Karlsruhe), und Merck (Darmstadt) bezogen.

2.2.2 Häufig verwendete Puffer

Puffer	Zusammensetzung	
Annexin-Bindepuffer	10 mM	HEPES
	140 mM	NaCl
	2,5 mM	CaCl ₂ (pH 7,4)
Beschichtungspuffer (ELISA)	100 mM	Natriumcarbonat (pH 9,6)
Blockierungspuffer 1 (ELISA)		PBS
	10 % (v/v)	FCS
Blockierungspuffer 2 (ELISA)		TBS
	5 % (v/v)	BSA
Blockierungspuffer 3 (Western Blot)		PBS
	5 % (w/v)	Milchpulver
Citratpuffer (ELISA)	0,03 M	Zitronensäure
	0,07 M	Natriumcitrat (pH 5,0)
Elutionspuffer	0,1 M	Glycin (pH 4,0)
FACS-Puffer		PBS
	10 % (v/v)	FCS
Laufpuffer (SDSPAGE)	25 mM	TrisHCl
	0,19 M	Glycin
	1 % (w/v)	SDS
Lysepuffer (eukaryotisch)	150 mM	NaCl
	30 mM	TrisHCl (pH 7,5)
	1 mM	PMSF
	10 % (w/v)	Glycerol
	1 % (w/v)	TritonX100

	1 Tablette	Complete Proteaseinhibitor /500 ml Puffer
Lysepuffer	500 mM	NaCl
(prokaryotisch)	50 mM	NaH ₂ PO ₄
	10 mM	Imidazol
	5 mM	TrisHCl (pH 7,0)
	0,5 mg/ml	Lysozym
	1 % (w/v)	Complete Proteaseinhibitor- Cocktail
MACS-Puffer		PBS
	0,5 % (w/v)	HSA
	2 mM	EDTA
Neutralisationspuffer	1 M	TrisHCl (pH 8,0)
Nicolettipuffer	0,1 % (w/v)	Natriumcitrat
	0,1 % (w/v)	Triton X100
	50 µg/ml	Propidiumiodid
OPD-Lösung (ELISA)	0,5 mg/ml	o-Phenylendiamin
	0,1 % (v/v)	H ₂ O ₂
PBS	137 mM	NaCl
	8,1 mM	Na ₂ HPO ₄
	2,7 mM	KCl
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄ (pH 7,4)
Probenpuffer reduz. (5x)	50 % (v/v)	Glycerol
(SDS-PAGE)	10 % (w/v)	SDS
	50 mM	TrisHCl (pH 6,8)
	25 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	0,25 mg/ml	Bromphenolblau
Sammelgel	24 mM	TrisHCl(pH 6,8)
(SDSPAGE)	5 % (w/v)	Acrylamid
	0,1 % (w/v)	SDS
	0,1 % (w/v)	APS
	0,1 % (w/v)	TEMED
Spaltungspuffer	50 mM	TrisHCl(pH 7,0)
(Proteinaufreinigung)	150 mM	NaCl

	1 mM	EDTA
	1 mM	DTT
TBS	20 mM	TrisHCL (pH 7,4)
	120 mM	NaCL
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM	TrisHCl
	0,19 M	Glycin
	20 % (v/v)	Methanol
	0,037 % (w/v)	SDS
Trenngel (SDS-PAGE)	37,5 mM	TrisHCl (pH 8,8)
	10 % (w/v)	Acrylamid
	0,1 % (w/v)	SDS
	0,03 % (w/v)	APS
	0,1 % (w/v)	TEMED
TST (Proteinaufreinigung)	50 mM	TrisHCl (pH 7,6)
	150 mM	NaCl
	0,05 % (v/v)	Tween 20
Waschpuffer 1 (Zytokin-ELISA)		PBS
	0,05 % (v/v)	Tween 20
Waschpuffer 2 (Annexin 1-ELISA)		TBS
	0,05 % (v/v)	Tween 20
Waschpuffer 3 (Western Blot)		PBS
	0,05 % (w/v)	Tween 20
HAc Proteinaufreinigung)	0,5 M	Essigsäure (pH 3,4)
NH ₄ Ac (Proteinaufreinigung)	5 mM	Ammoniumacetat (pH 5)

2.2.3 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Referenz
Jurkat	Humanes T-Zell-Lymphom	Schneider and Schwenk 1977
U937	Humanes Histiocytom	Sundstrom and Nilsson 1976

2.2.4 Verwendete Antikörper

Name	Antigen	Herkunft/Referenz
DAC5 Maus (IgG2a)	Annexin 1	(Weyd 2006)
anti-Annexin 1 Maus (IgG1)	Annexin 1	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CCR6 Alexa 647 Maus (IgG1)	CCR6	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD4 PerCP Maus (IgG1)	CD4	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD11b FITC Maus (IgG2a)	CD11b	Immuno Tools, Friesoythe
anti-CD11b PE Maus (IgG1)	CD11b	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
anti-CD11c FITC Maus (IgG1)	CD11c	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
anti-CD14 FITC Maus (IgG2a)	CD14	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD25 APC-Cy7 Maus (IgG1)	CD25	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD27 APC Maus (IgG)	CD27	eBioscience, San Diego, USA
anti-CD31 FITC Maus (IgG1)	CD31	Immunotech, Marseille, Frankreich
anti-CD45RO PE-Cy7 Maus (IgG2a)	CD45RO	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD62L PE Maus (IgG1)	CD62L	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD80 FITC Maus (IgG1)	CD80	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-CD83 APC	CD83	BD Pharmingen, Heidelberg

Maus (IgG1)		
anti-CD86 PE	CD86	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus (IgG2b)		
anti-FoxP3 PE	FoxP3	eBioscience, San Diego, USA
Maus (IgG2a)		
anti-HLA-DR APC	HLA-DR	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus (IgG2b)		
anti-human IgG APC	IgG	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus (IgG1)		
anti-human IgG HRP	IgG	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus (IgG1)		
anti-Erk	Erk 1	R&D Systems, Wiesbaden
Maus (IgG1)		
anti-Tubulin	Tubulin	Sigma, München
Maus (IgG1)		
anti-Maus IgG HRP	Maus IgG	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Ziege polyklonal		
Maus IgG1 Isotyp APC	-	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus (IgG1)		
Maus IgG1 Isotyp FITC	-	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus (IgG1)		
Maus IgG2a Isotyp PE	-	eBioscience, San Diego, USA
Maus (IgG2a)		
Maus IgG2b Isotyp APC	-	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus (IgGb)		

2.2.5 Reagenzien und Geräte

Gerät/Reagenz	Hersteller
7-AAD (7-Aminoactinomycin D)	Sigma, München
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma, München
Annexin 5 FITC	Caltag Laboratories, Burlingame, USA
BCA-Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
Benzonase	Merck, Darmstadt

Biocoll-Lösung	Biochrom, Berlin
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, München
Complete Proteaseinhibitor	Roche, Mannheim
Durchflusszytometer FACS-DIVA	Becton Dickinson, San Jose, USA
Vybrant DiD	Molecular Probes, Eugene, USA
ELISA-Photometer	Victor, Wallac, Gaithersburg, USA
ECL-Lösungen	Amersham, Little Chalfont, England
Fix/Perm Konzentrat	eBioscience, San Diego, USA
Fix/Perm Verdünner	eBioscience, San Diego, USA
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Karlsruhe
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Ochsenhausen
Gefrierschrank -80°C	Forma Scientific (Thermo), Dreieich
Glutamax	Gibco BRL, Karlsruhe
GSH-Sepharose-Kügelchen	Amersham, Little Chalfont, England
Humanes GMCSF	Leukine®, Schering, Berlin
Humanes IL4	Immunotools, Friesoythe
Humanes Serumalbumin (HSA)	Baxter, Unterschleißheim
IgG-Sepharose	Amersham, Little Chalfont, England
Inkubator für die Zellkultur	Steri-Cult, Forma Scientific (Thermo), Dreieich
IPTG	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma, München
Kühlzentrifuge Megafuge 3.0 RS	Heraeus (Thermo), Dreieich
LB-Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
LPS (aus E. coli 026:B6)	Sigma, München
LS-Säulen	Miltenyi, Gladbach
Magnetische Kügelchen gekoppelt an anti-CD14	Miltenyi, Gladbach
Mausserum	Dako, Glostrup, Dänemark
β -Mercaptoethanol	Neolab, Heidelberg
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
OptiEIA Zytokin-ELISA Kit	BD Pharmingen, Heidelberg

Pepsin-Agarose	Pierce, Rockford, USA
Permeabilisierungspuffer	eBioscience, San Diego, USA
Phorbol Myristat Acetat(PMA)	Sigma, München
Polymorphprep	Axis Shield, Oslo, Norwegen
PreScission Protease	Amersham, Little Chalfont, England
Protein-A-Sepharose	Amersham, Little Chalfont, England
RPMI-Medium	Gibco BRL, Karlsruhe
SDS-PAGE und Westernblot-Apparatur	Mini Protean II, BioRad, München
sterile Werkbank SteriGARD Hood	Baker, Sanford, USA
Tetramethyldiamin (TEMED)	Sigma, München
Tischzentrifuge Biofuge Fresco	Heraeus (Thermo), Dreieich
Trypsin/EDTA	Gibco BRL, Karlsruhe
UV-Strahler Stratalinker 2400	Stratagene, La Jolla, USA
Zählkammer n. Neubauer	HBG, Lützellinden

2.3 Methoden

2.3.1 Aufreinigung von rekombinantem Annexin 1

Humanes Annexin 1 wurde freundlicherweise von Björn Linke aus der Abteilung Immunogenetik, Schwerpunkt Tumormmunologie, Deutsches Krebsforschungszentrum, Leiter Prof. Dr. Peter H. Krammer, zur Verfügung gestellt. Die Präparation erfolgte nach dem folgenden Protokoll: Im Rahmen der Masterarbeit von Isabel Vogler aus derselben Abteilung wurden die Konstrukte zur bakteriellen Expression von rekombinantem humanen und murinen Annexin 1 hergestellt und ein Protokoll zur Aufreinigung entwickelt (Vogler 2005). Für die Aufreinigung wurde die DNA-Sequenz von Annexin 1 zunächst um die Sequenz für einen Abschnitt aus bakteriellem Protein A ergänzt. Das veränderte Annexin 1 wurde in BL21(DE3)pLysS pTK1 E. coli-Zellen mit Hilfe des bakteriellen Expressionsvektors pET41a(+) exprimiert. Insgesamt wurden 300 ml Vorkultur in LB-Medium mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (220 rpm) inkubiert. Anschließend wurde die Vorkultur 1:10 verdünnt und bis zu einer OD_{600} von 0,6 unter Schütteln kultiviert. Die Expression von Annexin 1 wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Nach 4 h wurden die Bakterien 30 min bei 2.070 x g und 4°C pelletiert und einmal mit PBS gewaschen. Das Pellet wur-

de gewogen und in einem vierfachen Volumen bakteriellen Lysepuffer unter Schütteln 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse erfolgte durch fünfmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Auftauen im Wasserbad bei 37°C. Unterdessen wurden pro Milliliter Lysat 200 μ l Protein-G-Sepharose-6-Kügelchen in einem Zentrifugenröhrchen mit je 50 ml der folgenden Puffer für 10 min bei 4°C rollend äquilibriert: 2 x TST, 1 x HAc, 1 x TST 1 x HAc, 2 x TST. Die Zentrifugationen erfolgten für 5 min bei 2.500 x g und 4°C. Nach Beendigung der Lyse wurde das Bakterienlysats mit Benzonase im Verhältnis 1:2000 versetzt und 30-60 min bei Raumtemperatur geschüttelt, bis die Lösung flüssig wurde. Nach Zentrifugation für 30 min bei 13.300 x g und 4°C wurde der Überstand des Bakterienlysats auf die äquilibrierten Sepharose-Kügelchen gegeben und 12 h bei 4°C rollend inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Kügelchen 5 min bei 2500 x g und 4°C zentrifugiert und nach vollständigem Entfernen des Überstandes mit je 50 ml der folgenden Puffer je 10 min bei 4°C rollend gewaschen: 3 x TST, 1 x NH₄Ac, 1 x Spaltungspuffer. Zu je 100 μ l Kügelchen wurden 250 μ l Spaltungspuffer und 8 Einheiten PreScission-Protease gegeben, um das Annexin 1-Konstrukt von der Protein A-Domäne zu trennen, die an den Kügelchen verblieb. Die Proteolyse erfolgte rollend über Nacht bei 4°C. Danach wurden die IgG-Kügelchen 10 min bei 1.840 x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Röhrchen überführt. Die Kügelchen wurden ein weiteres Mal mit einem kleinen Volumen Spaltungspuffer gewaschen. Die Überstände beider Zentrifugationen wurden vereinigt. Die PreScission-Protease trug ein GST-Tag und wurde im folgenden Schritt über eine Inkubation mit GSH-Kügelchen aus der Präparation entfernt. Für 3 Liter Ursprungskultur wurde 4 ml GSH-Kügelchen 5 min bei 460 x g und 4°C pelletiert und der Überstand vollständig entfernt. Die Äquilibrierung der Kügelchen erfolgte durch zweimaliges Waschen mit 50 ml kaltem PBS. Die Proteinlösung wurde zugegeben, und das Gemisch 2 h bei 4°C rollend inkubiert. Die anschließende Zentrifugation erfolgte für 5 min bei 460 x g und 4°C und wurde mehrfach wiederholt, um in der Lösung verbliebene GSH-Kügelchen zu entfernen. Schließlich wurde die Proteinlösung gegen PBS dialysiert (MWCO 10.000) und bei 4°C gelagert.

2.3.2 Zytokin-ELISA

Der ELISA (engl.: enzyme-linked immunosorbent assay) ist eine Methode zum Nachweis löslicher Proteine. Die spezifische Erkennung erfolgt durch Antikörper und kann

durch eine Enzymreaktion detektiert und quantifiziert werden. Ein Vorteil dieser Methode gegenüber dem Western Blot ist, dass das Protein in seiner nativen Struktur erkannt wird und der Nachweis quantitativ erfolgt. Zur Bestimmung der Konzentration von TNF wurden OptiEIA-Kits der Firma BD Pharmingen verwendet, die nach dem Sandwich-ELISA-System aufgebaut sind. Protein-Standards und Antikörper wurden nach Herstellerangaben verdünnt. Das Volumen der Proben und des Standards betrug abweichend von den Angaben des Herstellers 50 μ l pro Loch, da 96-Loch-Platten mit der Hälfte der Standard-Fläche verwendet wurden. Die Beschichtung der Platten mit Fänger-Antikörper in Beschichtungspuffer erfolgte über Nacht bei 4°C. Danach wurden die Platten fünfmal mit Waschpuffer 1 gewaschen und zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen für 1 h bei Raumtemperatur (RT) mit Blockierungspuffer 1 inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurde der Zellkulturüberstand auf die Platten gegeben und 1,5 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten fünfmal gewaschen und für 1 h bei RT mit dem Detektions-Antikörper und Streptavidin-Peroxidase inkubiert. Nach achtmaligem Waschen erfolgte die Entwicklung mit OPD-Substratlösung (5-10 min). Die Reaktion wurde mit 25 μ l 1,5 M H₂SO₄ abgestoppt und die Farbsintensität bei 490 nm im ELISA-Photometer bestimmt.

2.3.3 Annexin 1-ELISA

Zum Nachweis von Autoantikörpern gegen Annexin 1 in humanem Serum wurde ein ELISA-System etabliert. Dabei wurde 96-Well-Platten mit 5 μ g/ml rekombinantem Annexin 1 in Annexin-Bindpuffer 2 h bei RT beschichtet. Zur internen Kontrolle der Spezifität wurde nur die Hälfte der Wells mit Annexin 1 inkubiert, die andere Hälfte wurde nur mit Annexin-Bindpuffer behandelt. Anschließend wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer 2 gewaschen und anschließend mit Blockierungspuffer 2 für 2 h inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Danach wurde die Platte erneut dreimal mit Waschpuffer 2 gewaschen. Die zu testenden Serum wurden in einer Verdünnung von 1:20 in Blockierungspuffer 2 verdünnt und sowohl auf die mit Annexin 1 beschichtete Seite, als auch auf die unbeschichtete Seite aufgetragen. Durch die Werte der unbeschichteten Seite ließ sich bei der Detektion die unspezifische Bindung der einzelnen Seren bestimmen und dieser Wert wurde vom Wert auf der Seite mit Annexin 1-Beschichtung abgezogen. Als Referenz wurde ein positives Serum verwendet, das in 1:10, 1:20 und 1:40 Verdünnung aufgetragen wurde, und als weitere interne Kontrollen wurden drei negative Seren auf jeder Platte mitgeführt, die eben-

falls 1:20 verdünnt wurden. Nach einer Inkubation von 40 min bei RT wurde die Platte fünfmal mit Waschpuffer 2 gewaschen und dann mit anti-human IgG HRP-Antikörper für 40 min bei RT inkubiert, in einer 1:1000 Verdünnung in Blockierungspuffer 2. Nach achtmaligem Waschen mit Waschpuffer 2 erfolgte die Entwicklung mit OPD-Substratlösung (3 min). Die Reaktion wurde mit 25 μ l 1,5 M H_2SO_4 abgestoppt und die Farbintensität bei 490 nm im ELISA-Photometer bestimmt. Nach Abzug der individuellen Hintergrundwerte von der nicht beschichteten Seite der Platte, wurde die 1:10 Verdünnung des positiven Serums als 100 %-Wert gesetzt und alle weiteren Messwerte prozentual darauf bezogen.

2.3.4 Aufreinigung von Autoantikörpern gegen Annexin 1 aus humanem Serum

Im Serum ist neben Antikörpern auch eine Vielzahl von anderen Proteinen enthalten. Um die Eigenschaften der Antikörperfraktion zu untersuchen, ist es notwendig diese vom restlichen Serum abzutrennen. Eine Möglichkeit besteht darin, zur Aufreinigung Protein A-Sepharose zu verwenden. Protein A bindet spezifisch Immunglobuline. Die Isotypen IgG 1, 2 und 4 werden mit hoher Affinität gebunden, während IgG3, IgA, IgE und IgM mit niedriger Affinität gebunden werden. Da Autoantikörper überwiegend dem IgG-Typ angehören, eignet sich Protein A gut zur Aufreinigung dieser Fraktion. Durch die Immobilisierung auf Sepharose-Kügelchen lassen sich die gebundenen Antikörper durch Zentrifugation abtrennen.

Zur Aufreinigung wurden 100 μ l Serum mit 100 μ l TBS und 50 μ l Protein A-Sepharose für 2 h bei 4°C unter Rotieren gebunden. Danach wurde mit TBS viermal gewaschen (Zentrifugation 1 min, 4000 x g, 4°C) und zur Elution 100 μ l Elutionspuffer zugegeben und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden 50 μ l des Überstandes abgenommen und mit 25 μ l Neutralisationspuffer gemischt. Zu den Sepharose-Kügelchen wurden weiter 50 μ l Elutionspuffer gegeben und nach erneuter Zentrifugation 50 μ l des Überstandes abgenommen und mit dem ersten Eluat vereinigt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mit BCA-Assay bestimmt.

2.3.5 Bestimmung der Proteinkonzentration in Lösung

Die Konzentration von Proteinen in Lösung kann über verschiedene Verfahren bestimmt werden. Eine einfache Methode ist der Nachweis mit Hilfe von Kupfersulfat

und Bicinchoninsäure (BCA). Zunächst reduzieren die Peptidbindungen des Proteins Cu^{2+} zu Cu^{1+} . Die Cu^{1+} -Ione werden von je zwei Molekülen Bicinchoninsäure chelatiert; es entsteht ein dunkelvioletter löslicher Komplex, dessen Absorption bei 560 nm bestimmt werden kann. Die Reaktion wird durch Detergenzien und reduzierende Reagenzien gestört.

Die Bestimmung wurde mit einem BCA-Kit der Firma Pierce nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. 100 μl BCA-Färbelösung wurden in 96-Loch-Platten mit 10 μl der Proteinlösungen bzw. eines BSA-Standards versetzt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die Intensität der Färbung wurde über die Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 560 nm im ELISA-Photometer bestimmt.

2.3.6 Immunopräzipitation von Annexin 1 durch Autoantikörper im Serum von Patienten mit SLE

Um herauszufinden, ob Autoantikörper gegen Annexin 1 im Serum von Patienten mit SLE vorhanden sind, kann man neben dem ELISA auch die Methode der Immunopräzipitation verwenden. Dazu wird Serum mit Annexin 1 und Protein A-Sepharose inkubiert, wobei die Antikörper aus dem Serum an die Protein A-Sepharose-Kügelchen binden. Falls Antikörper gegen Annexin 1 enthalten sind, wird Annexin 1 durch diese auf den Sepharose-Kügelchen immobilisiert und kann nach der Elution mit SDS-PAGE und Westernblot nachgewiesen werden.

Zur Immunopräzipitation werden pro Serumprobe 100 μl mit 1 μg Annexin 1 vorge-mischt und aus dem Mastermix in 100 μl Aliquots verteilt. Dann werden diese mit 100 μl Serum und 100 μl Annexin-Bindpuffer gemischt und 1 h bei 4°C rollend inkubiert. Danach werden die Proben fünfmal mit Annexin-Bindpuffer gewaschen (Zentrifuga-tion 1 min, 4000 x g, 4°C) und mit 20 μl reduzierendem Probenpuffer (1:5 verdünnt mit TBS) für 10 min bei 95°C aufgeköcht und anschließend auf ein SDS-Gel aufgetragen.

2.3.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteingemischen nach Größe (Laemmli 1970). Das Gel besteht aus einem polymerisierten Gemisch aus Acryl-amid und Bisacrylamid. Durch das Verhältnis der beiden Chemikalien kann die Poren-größe des entstehenden Gels variiert und dem Molekulargewicht der aufzutrennenden

Proteine angepasst werden. Die denaturierten Proteine werden mit Natriumdodecylsulfat (SDS) beladen, das sich mit seinem hydrophoben Rest an die Aminosäurekette anlagert. Die Anzahl der angelagerten SDS-Moleküle ist annähernd proportional zum Molekulargewicht des Proteins. Da jedes Dodecylsulfat-Molekül eine negative Ladung besitzt, wandern die Proteine im Gel Richtung Anode. Die Laufweite verhält sich umgekehrt proportional zum Logarithmus der Masse.

Die Gele bestanden aus einem 5-prozentigen Trenngel und einem 10- bis 12-prozentigen Sammelgel. Die Gelzusammensetzung ist bei den Puffern aufgeführt.

Die Polymerisation wurde mit Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat (APS) gestartet. Die Proteinproben wurden mit reduzierendem Probenpuffer (5x) im Verhältnis 1:5 versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei 80 V. Die Gele wurden direkt für Western Blot verwendet.

2.3.8 Western Blot

Der Western Blot ist eine Methode zum Nachweis spezifischer Proteine in einem nach Größe aufgetrennten Proteingemisch. Die in einem SDS-Gel aufgetrennten Proteine werden elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mit Hilfe von Peroxidase-gekoppelten Antikörpern und einem chemilumineszenten Substrat mit Hilfe einer CCD-Kamera sichtbar gemacht.

Das Ergebnis der Immunopräzipitation wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Semi-Dry-Verfahren geblottet. Gel und Membran befinden sich zwischen zwei horizontalen Metallplatten (Anode und Kathode), der Kontakt zu Kathode und Anode wird durch je drei Lagen mit Transferpuffer benetztem Filterpapier hergestellt. Der Transfer erfolgte über einen Zeitraum von 1 h 45 min bei 0,8 mA/cm² Membran.

Nach dem Transfer wurden die freien Bindungsstellen der Membran durch einstündige Inkubation in Blockierungslösung 3 abgesättigt. Die Inkubation mit dem Erstantikörper (anti-Annexin 1) erfolgte für 1 h. Nach drei zehnminütigen Waschschritten mit Waschpuffer 3 wurde die Membran für ca. 1 h mit einem HRP-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert (anti-Maus IgG HRP, Verdünnung 1:10.000 in Waschpuffer 3). Nach dreimaligem Waschen folgten die Zugabe chemilumineszenter ECL-Lösung und die Aufnahme mit der CCD-Kamera.

2.3.9 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Arbeiten zur Kultivierung eukaryotischer Zellen wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Eukaryotischen Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert. Als Zellkulturmedium wurde RPMI 1640 verwendet, das vor Gebrauch mit 10 % (v/v) FCS und 1 % (v/v) Glutamax supplementiert wurde (supplementiertes RPMI). Für die Differenzierung und Aktivierung primärer Zellen wurden verschiedene Zytokine verwendet. Nach Erhalt wurden die Zytokine in sterilem, LPS-freiem PBS mit 0,1 % (w/v) BSA gelöst und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.3.10 Präparation primärer humaner neutrophiler Granulozyten

Im Körper eines Erwachsenen werden jeden Tag ca. 1×10^{11} neutrophile Granulozyten produziert: sie machen somit 50-65 % aller Lymphozyten aus. Mittels gradueller Dichtezentrifugation über Histopaque lassen sich die neutrophilen Granulozyten aus humanem Blut aufreinigen. *In vitro* sterben sie innerhalb von vier Tagen auf Grund fehlender Überlebenssignale durch Zytokine. Dies spiegelt die kurze Lebensdauer der neutrophilen Granulozyten *in vivo* wider, die etwa 6 Stunden im peripheren Blut beträgt. Somit stellen sie ein gutes zelluläres Modell zur Untersuchung des spontanen Apoptoseverhaltens von Leukozyten dar.

Primäre humane neutrophile Granulozyten wurden durch eine Dichte-Zentrifugation aus 80 ml heparinisiertem Vollblut isoliert. 4 ml Polymorphprep wurden mit 5 ml Blut vorsichtig überschichtet und zentrifugiert (40 min bei 470 x g und 20°C, ohne Bremse). Nach der Zentrifugation flotieren die mononukleären Lymphozyten auf dem Polymorphprep, während sich die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten als Ring in der Interphase sammeln. Die Erythrozyten werden unter diesen Bedingungen pelletiert. Der obere Ring aus mononukleären Lymphozyten wurde vorsichtig entfernt und für die Präparation von Monozyten verwendet. Die neutrophilen Granulozyten des unteren Ringes wurden vereint und zum Ausgleich der Molarität in ein gleiches Volumen 0,45 % NaCl-Lösung gegeben. Nach Zentrifugation (10 min bei 820 x g und 20°C) wurde der Überstand verworfen und die verbliebenen Erythrozyten durch einminütige Inkubation in eiskalter 0,2 % NaCl-Lösung hypoton lysiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 5 ml eiskalter 1,6 % NaCl-Lösung gestoppt, und die neutrophilen Granulozyten nach erneuter Zentrifugation in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml in

supplementierten RPMI-Medium in 6-Loch-Zellkulturplatten (3 ml pro Loch) ausgesät und bis zur weiteren Verwendung im Brutschrank inkubiert.

2.3.11 Präparation primärer humaner Monozyten

Die Präparation von Monozyten erfolgte aus Vollblut nach Präparation von neutrophilen Granulozyten mit einem CD14-Magnetic-Bead-Kit der Firma Miltenyi. Die Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellers, jedoch wurden die Volumina der Antikörperlösung und der Kügelchen-Suspension halbiert, um eine CD14⁺-Population besonders hohen Reinheitsgrads zu erhalten.

Die Lymphozyten wurden je 1×10^7 Zellen in 80 μ l MACS-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 10 μ l anti-CD14-Kügelchen-Suspension je 1×10^7 Zellen für 15 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden mit 2 ml MACS-Puffer je 1×10^7 Zellen gewaschen und für 10 min bei 300 x g und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 500 μ l MACSPuffer je 1×10^8 Zellen resuspendiert und über eine LS-Säule in einem magnetischen Zellseparator gegeben. Die Säule wurde dreimal mit je 3 ml MACS-Puffer gewaschen. Die Säule wurde aus dem Magnetfeld entfernt und die CD14⁺ Monozyten mit 5 ml MACS-Puffer eluiert. Die Monozyten wurden gezählt, pelletiert (10 min bei 300 x g und 20°C) und in einer Konzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen in supplementiertem RPMI-Medium in 6-Loch-Platte ausgesät (3 ml pro Loch).

2.3.12 Präparation primärer humaner Lymphozyten

Zur Quantifizierung und Charakterisierung von Treg mittels Durchflusszytometrie wurden Lymphozyten aus 80 ml Vollblut isoliert. Das Vollblut wurde auf 200 ml mit PBS aufgefüllt. Je 15 ml Ficoll (Biochrom) wurden langsam mit 30 ml Blut überschichtet und anschließend bei 2420 rpm und 20°C für 20 min ohne Bremse zentrifugiert. Die Lymphozytenringe in der Interphase wurden vereinigt, mit 50 ml PBS aufgefüllt und bei 1500 rpm und 20°C für 10 min abzentrifugiert. Die Zellen wurden einmalig mit PBS gewaschen und anschließend in 50 ml supplementiertem RPMI resuspendiert. Durch Inkubation für 20 min bei 37°C in einer Zellkulturflasche wurden die adhärenen Monozyten weitgehend depletiert. Der Überstand wurde abgenommen und für die durchflusszytometrischen Untersuchungen verwendet.

2.3.13 Differenzierung primärer humaner DC

Die Differenzierung von DC erfolgte ausgehend von frisch isolierten Monozyten durch sechstägige Kultivierung in GMCSF- und IL4-haltigem Medium (Sallusto and Lanzavecchia 1994). Die adhärenenten Zellen wurden in 6-Loch Zellkulturplatten mit 3 ml supplementiertem RPMI-Medium kultiviert. Das Medium enthielt zusätzlich 1000 U/ml GMCSF und 500 U/ml IL-4. Nach drei Tagen wurden pro Loch 0,5 ml Medium mit 3500 U/ml GMCSF und 1500 U/ml IL-4 zugegeben. Nach insgesamt sechs Tagen wurden die unreifen DC vorsichtig mit dem Zellkultur-Überstand abgenommen, und 1×10^5 Zellen pro Loch in 48-Loch-Zellkulturplatten umgesetzt.

2.3.14 Differenzierung von U937-Zellen

U937-Zellen sind humane monozytische Suspensionszellen, die durch verschiedene Substanzen zu adhärenenten Zellen differenziert werden können, die in ihrem Phänotyp DC ähneln. 45×10^6 U937-Zellen wurden in 30 ml supplementiertem RPMI in einer 75 cm² Zellkulturflasche ausgesät und mit 10 µg/ml beziehungsweise 100 µg/ml Phorbolmyristatacetat (PMA) für drei bis vier Tage differenziert. Die differenzierten Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und für 4 min mit Trypsin/EDTA vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Nach Abstoppen der proteolytischen Reaktion mit 12 ml Medium wurden die Zellen pelletiert (5 min bei 460 x g und 4°C) und ohne Verzögerung in 48-Loch-Platten ausplattiert (1×10^5 Zellen pro Loch), um ein Aggregieren der Zellen in Suspension zu verhindern.

2.3.15 Apoptose-Induktion

Um frühapoptotische Zellen zu erhalten, wurden Jurkat T-Zellen mit 50 mJ/cm² UVC-Strahlung bestrahlt (6-Loch-Platten, 2,5 ml Zellsuspension pro Loch) und für 4 h in supplementiertem RPMI-Medium bei 37°C inkubiert. Primäre neutrophile Granulozyten sterben nach Entnahme aus dem Körper durch Entzug von Überlebenssignalen spontan und zeigen etwa 24 h nach Blutentnahme die typischen Charakteristika frühapoptotischer Zellen.

2.3.16 Kokultur-Experimente mit apoptotischen Zellen

Um zu untersuchen, ob apoptotische Zellen die Zytokinsekretion und Reifung von Phagozyten beeinflussen, wurden Kokultur-Experimente durchgeführt.

Je 1×10^5 (U937, bzw. DC) Phagozyten wurden in 500 μl supplementiertem RPMI-Medium in 48-Loch-Platten ausgesät. Nachdem die Zellen adhärirt hatten (30-60 min), wurde das Medium ausgetauscht und frühapoptotische Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:5 (Phagozyten zu apoptotischen Zellen) zugegeben. Als frühapoptotische Zellen dienten mit UVC bestrahlte J16 T-Zellen beziehungsweise primäre humane neutrophile Granulozyten an Tag 1 nach Isolation. Nach 3 h wurden die Zellen mit bakteriellem LPS (aus E. coli 026:B6) stimuliert. Nach ca. 18 h wurden 250 μl Überstand entnommen und durch frisches Medium ersetzt. Die Überstände wurden im ELISA auf TNF-Sekretion untersucht, die Zellen weiter im Brutschrank inkubiert und ca. 48 h nach LPS-Zugabe in Bezug auf die Expression von Oberflächenmarkern im Durchflusszytometer untersucht. Wenn Annexin 1 auf den apoptotischen Zellen durch den Einsatz von anti-Annexin 1 Antikörpern aus dem Serum von Patienten mit SLE blockiert wurde, wurden die apoptotischen Zellen vor ihrer Zugabe zu den Phagozyten 15 min mit der Antikörperlösung vorinkubiert und dann mit sterilem PBS gewaschen und in supplementiertem RPMI zugegeben.

2.3.17 Vybrant DiD-Markierung von J16 T-Zellen

Vybrant DiD ist ein lipophiler Farbstoff, der sich in die Membranen lebender Zellen einlagert und im Durchflusszytometer nachweisbar ist. Für die Markierung mit Vybrant DiD wurden J16 T-Zellen für 5 min bei 5000 x g und 20°C pelletiert und einmal mit sterilem PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml sterilem PBS resuspendiert und mit 1 μl Vybrant DiD pro 1×10^6 Zellen 1 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 5 min bei 5000 x g und 20°C zentrifugiert und vorsichtig in angewärmtem supplementiertem RPMI-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden einmal mit Medium gewaschen und bis zur weiteren Verwendung in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml im Brutschrank inkubiert.

2.3.18 Phagozytose-Experimente

Um den Einfluss von Autoantikörpern aus dem Serum von Patienten mit SLE auf die Aufnahme-Kapazität der Phagozyten zu untersuchen, wurden Phagozytose-Experimente mit DiD-markierten apoptotischen Zellen durchgeführt. J16 T-Zellen wurden erst wie oben beschrieben mit UVC-Licht bestrahlt und anschließend mit Vybrant DiD markiert. Phagozyten (U937-Zellen, bzw. DC) wurden in 24-Loch-Platten ausgesät (2×10^5 Zellen pro Loch) und 12 h im Brutschrank inkubiert. Kurz vor Zugabe der apoptotischen J16 T-Zellen (zwischen 2×10^5 und 1×10^6) wurden diese mit $3 \mu\text{g}$ der Antikörperlösungen aus unterschiedlichen Seren für 15 min bei 37°C inkubiert und mit PBS gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Danach wurden die apoptotischen J16 T-Zellen in supplementiertem RPMI-Medium zugegeben, und nach unterschiedlichen Zeitpunkten entsprechend der Kinetik auf Eis abgestoppt und geerntet. Die Phagozyten wurden nach dem Abstoppen zusätzlich mit einem geeigneten FITC-markierten Antikörper markiert (anti-CD31 Antikörper für U937, bzw. anti-CD11b Antikörper für DC), so dass doppelt positive Zellen (FITC und DiD) leicht identifiziert werden konnten. Die Phagozytose wurde im FACS bestimmt. Als interne Kontrolle wurden unbestrahlte J16 T-Zellen verwendet, die analog zu den bestrahlten Zellen behandelt wurden.

2.3.19 Durchflusszytometrische Analyse

Im Durchflusszytometer kann die Expression eines oder mehrerer Proteine auf oder in einer Zelle quantifiziert werden. Dies geschieht durch die spezifische Bindung von fluorochrommarkierten Antikörpern an die entsprechenden Epitope, die dann nach Anregung mit einem Laserstrahl durch die Emission in dem für das Fluorochrom typischen Bereich quantifiziert werden kann. Die Zellen einer Suspension werden im Gerät vereinzelt und mit ein oder zwei Laserstrahlen verschiedener Wellenlänge bestrahlt. Durch das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht werden Größe und Granularität der Zellen bestimmt, so dass sich Populationen mit unterschiedlichen Eigenschaften voneinander unterscheiden lassen. Ein Durchflusszytometer ermöglicht die gleichzeitige Analyse mehrerer Oberflächenantigene auf Einzelzellebene. Durch eine Fixierung der Zellen ist auch der Nachweis von intrazellulärer Proteine möglich.

Zur Analyse der Expression verschiedener Oberflächenmarker wurden 2×10^5 Zellen durch fünfminütige Zentrifugation bei $460 \times g$ und 4°C pelletiert. Die Überstände

wurden verworfen, und die Zellen für 15 min mit 25 μ l 20 % Maus- oder Rattenserum in FACS-Puffer inkubiert (je nach Ursprung der verwendeten Antikörper), um Fc-Rezeptoren abzusättigen. Alle Inkubationen erfolgten auf Eis, um eine Internalisierung von Oberflächenmoleküle zu verhindern. Für die Antikörper wurde ein Mastermix angesetzt (je 3 μ l Antikörper pro 50 μ l Färbevolumen) und in 25 μ l Aliquots auf die Proben verteilt. Nach 15 min Inkubation wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und in 100 μ l FACS-Puffer für die Analyse im FACS aufgenommen.

Zum Nachweis von intrazellulärem FoxP3 wurden 5×10^6 Zellen verwendet und zuerst, wie bereits beschrieben, mit Antikörpern gegen Oberflächenmarker gefärbt (Mastermix: je 6 μ l Antikörper pro 26 μ l Färbevolumen, 15 μ l/Probe, 20 min Inkubation). Danach folgte ein Waschschrift mit PBS und eine fünfminütige Zentrifugation bei 460 x g und 4°C. Nach Zugabe von 750 μ l Fix/Perm-Puffer (Verdünnung nach Angaben des Herstellers) wurden die Zellen für 30 min inkubiert. Nachfolgend wurden sie einmal mit PBS und zweimal mit Permeabilisierungspuffer gewaschen in 98 μ l Permeabilisierungspuffer mit 2 % Rattenserum für 15 min inkubiert und anschließend mit 20 μ l anti-FoxP3 Antikörper versetzt und weiter 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Permeabilisierungspuffer wurden die Zellen in 250 μ l PBS ausgenommen und im Durchflusszytometer analysiert.

Um nachzuweisen, dass Autoantikörpern aus dem Serum von Patienten mit SLE an apoptotische Zellen binden, wurden 2×10^5 Zellen für 15 min mit 5 μ g Antikörperlösung inkubiert und nach Waschen mit Annexin-Bindepuffer mit anti-human IgG APC als Zweitantikörper für 15 min gefärbt. Nach erneutem Waschen in 100 μ l Annexinbindepuffer für die Analyse aufgenommen.

Auch für die Analyse von Annexin 1 (DAC5) sowie die Analyse von Phosphatidylserin (Anx5) wurde statt FACS-Puffer Annexin-Bindepuffer verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der Software DIVA.

2.3.20 Bestimmung der Apoptose nach Nicoletti

Mit Hilfe einer von Nicoletti und Kollegen etablierten Methode lassen sich apoptotische Zellkerne aufgrund ihres geringeren DNA-Gehaltes von Zellkernen lebender Zellen unterscheiden (Nicoletti et al. 1991). Der Fluoreszenzfarbstoff dringt in die Zellkerne ein und interkaliert in die DNA, sodass die Kerne ihrem DNA-Gehalt entsprechend fluoreszieren. Neben den vitalen diploiden und den in Teilung befindlichen tetraploi-

den Zellkernen lassen sich die apoptotischen Zellkerne mit subdiploidem DNA-Gehalt quantifizieren. 2×10^5 Zellen wurden in $250 \mu\text{l}$ Nicolettipuffer für 12-48 h bei 4°C unter Lichtabschluss lysiert und im Durchflusszytometer analysiert. Die spezifische Apoptose wurde folgendermaßen berechnet: $\frac{\% \text{ experimentelleApoptose} - \% \text{ spontaneApoptose}}{100 \% \text{ spontaneApoptose}} \times 100$.

2.3.21 Statistische Analyse

Alle Daten dieser Arbeit werden als individuelle Werte sowie als Mediane dargestellt. Der Mann-Whitney-U-Test wurde mit einem Konfidenzintervall von 95 % zur Prüfung statistischer Signifikanz verwendet. Der Test wurde als signifikant angesehen, wenn p kleiner als 0.05 war. Für die Berechnungen wurden die Programme GraphPad Prism 4 (GraphPad Software Inc.) und SPSS 12 (SPSS Inc.) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Das Apoptoseverhalten neutrophiler Granulozyten von Patienten mit SLE zeigt keine pathologische Veränderung

SLE ist durch das Vorhandensein von Autoantikörpern gegen nukleäre Antigene und gegen intrazelluläre Strukturen wie dsDNA gekennzeichnet. Diese Antikörper sind nicht nur pathognomonisch, sondern spiegeln auch den Aktivitätsstatus der Erkrankung wider. Eine mögliche Ursache der Entstehung dieser Antigene sind apoptotische Zellen (Casciola-Rosen et al. 1994; Rosen and Casciola-Rosen 1999; Voll et al. 1997). Daher könnte ein vermehrtes Auftreten von apoptotischen Zellen im Blut in der Pathogenese des SLE eine Rolle spielen. Eine größere Anzahl apoptotischer Zellen könnte durch vermehrte oder beschleunigte Apoptose entstehen und somit die Kapazitäten der phagozytierenden Zellen überlasten. Durch die längere Verweildauer der Zellen würden die sterbenden Zellen in einem Stadium der späten Apoptose oder der sekundären Nekrose von DC aufgenommen werden und diese aktivieren (Janeway 1992; Matzinger 1994). Um zu untersuchen, ob Leukozyten aus dem Blut von Patienten mit SLE im Vergleich zu Leukozyten von gesunden Kontrollen vermehrt oder beschleunigt einen apoptotischen Zelltod sterben, wurden neutrophile Granulozyten isoliert und ihre spontane Apoptose mittels durchflusszytometrischer Methoden untersucht.

Wie Abbildung 4 zeigt, exponieren an Tag 1 nach der Isolation bereits 40-50 % der neutrophilen Granulozyten PS in der äußeren Membran. Die Externalisierung von PS ist ein frühes Ereignis in der Apoptose. An Tag 2 und 3 nach der Präparation sind alle Zellen PS-positiv. In der kumulativen Darstellung (Abb. 4A) lassen sich keine signifikanten Unterschiede in den Mittelwerten der durchschnittlichen Fluoreszenzstärke (engl. mean fluorescence intensity = MFI) zwischen den Neutrophilen der Patienten mit SLE und der gesunden Kontrollen erkennen. An Tag 1 lässt sich auch bereits DNA-Fragmentierung nachweisen (Abb. 4B). Der Median liegt bei 51,3 % für gesunde Kontrollen und bei 22,3 % für Patienten mit SLE, ist aber auf Grund der hohen Streuung nicht signifikant unterschiedlich. An Tag 3 ist dieser Wert bis auf 85,1 % bei den gesunden Kontrollen und 78,4 % bei den Patienten mit SLE angestiegen. Auch hier sind im statistischen Vergleich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen messbar. Die anfänglichen Unterschied in diesen Experimenten sind eher auf die hohe Streuung und die geringe Anzahl an Patienten

zurückzuführen. Dies bestätigt sich auch dadurch, dass die Werte an Tag 2 und 3 vergleichbar sind. Der Verlust der Membranintegrität als spätes apoptotisches Ereignis ist in vollem Ausmaß erst an Tag 3 zu beobachten (Abb. 4C). Auch hier lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen neutrophilen Granulozyten von Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen beobachten. Zusammenfassend können keine Unterschiede zwischen neutrophilen Granulozyten von Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen im Apoptoseverhalten festgestellt werden, weder quantitativ noch im Bezug auf den zeitliche Verlauf.

3.2 Apoptotische neutrophile Granulozyten haben einen suppressiven Effekt auf U937-Zellen

Apoptotische Zellen werden *in vitro* durch phagozytierende Zellen wie DC oder Makrophagen aufgenommen und verändern deren Verhalten dahingehend, dass diese Zellen schlechter auf Aktivierungssignale reagieren. Dadurch wird verhindert, dass DC, die apoptotische Zellen aufgenommen haben, nach Aktivierung ihrerseits selbstreaktive T-Zellen durch körpereigene Peptide aktivieren. Dies könnte ein wichtiger Mechanismus zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz sein. Es wurde postuliert, dass bei Patienten mit SLE die Toleranzinduktion durch apoptotische Zellen gestört ist. Zum einen könnten die apoptotischen Zellen direkt diesen Effekt hervorrufen, indem die Anzahl zu groß ist und die Phagozytosekapazitäten überlastet sind. Zum anderen können veränderte Signale der apoptotischen Zellen an die Phagozyten die gleiche Wirkung hervorrufen und dadurch den tolerogenen Effekt apoptotischer Zellen verringern.

Um zu untersuchen, ob die Interaktion von apoptotischen neutrophilen Granulozyten und DC in Patienten mit SLE verändert ist, wurde ein *in vitro*-System mit Zellen etabliert, die ein DC-ähnliches Verhalten aufweisen. Dadurch konnten spenderabhängige Schwankungen der DC-Aktivität vermieden werden. Es wurde die monozytische Zelllinie U937 verwendet, die durch den Phorbolester PMA dahingehend differenziert werden kann, dass die Zellen viele Eigenschaften unreifer DC aufweist: differenzierte U937-Zellen exprimieren ähnliche Moleküle auf ihrer Oberfläche wie DC (Abb. 5A). Dazu gehören CD11b und das DC-typische CD11c, sowie CD83 und HLA-DR. Auch zeigen sie ähnlich wie DC keine Oberflächenexpression von CD14, CD80 und CD86. Nach Stimulation der Zellen mit LPS werden die kostimulatorischen Moleküle CD80, CD83,

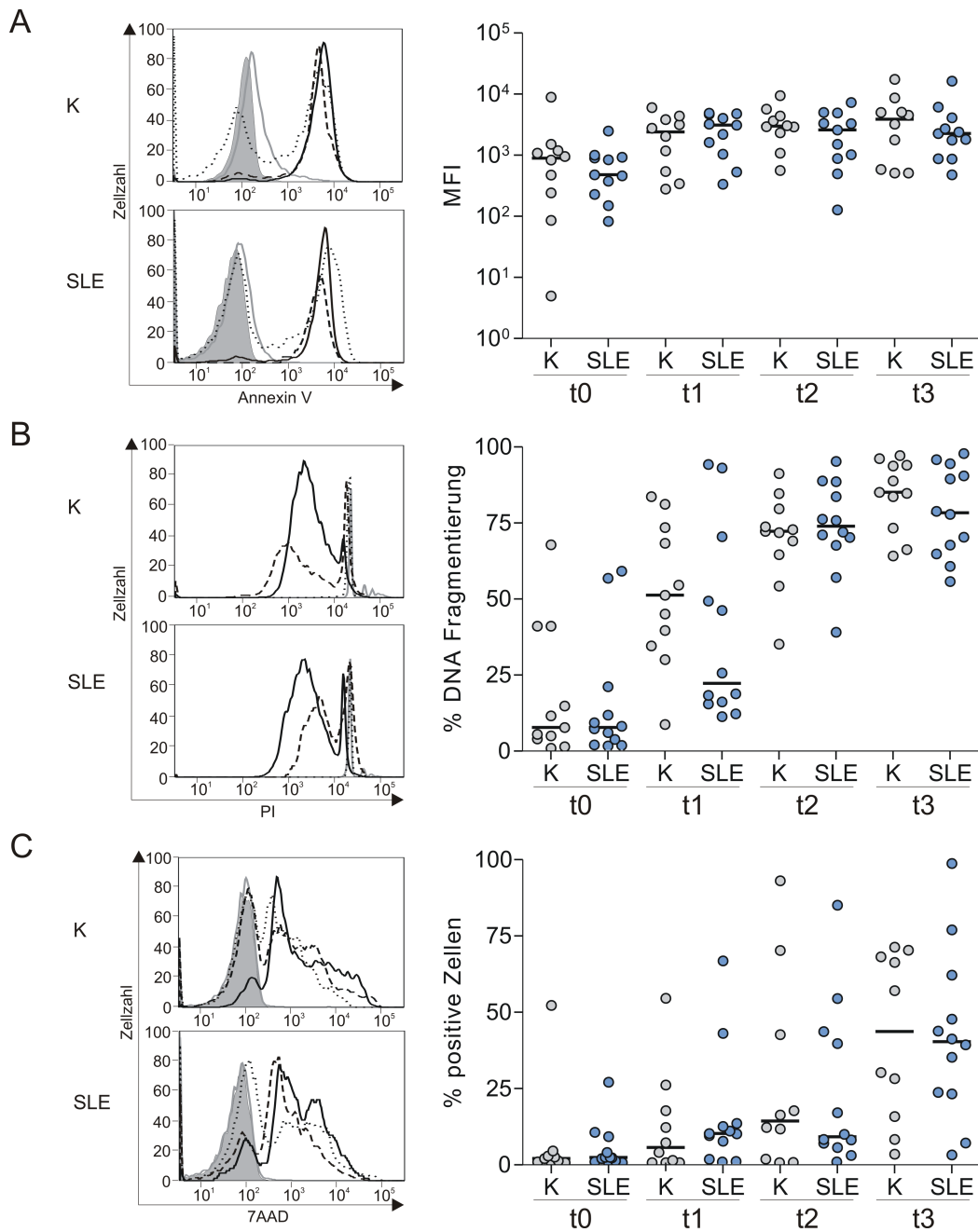


Abbildung 4: Apoptosekinetik primärer neutrophiler Granulozyten von Patienten mit SLE im Vergleich zu gesunden Kontrollen (K). (A) Neutrophile Granulozyten wurden mit Annexin 5 gefärbt und nach der Isolierung an vier aufeinanderfolgenden Tagen (Tag 0-3 = t0-3) im Durchflusszytometer analysiert, um den Anteil apoptotischer Zellen zu bestimmen (Mediane SLE bzw. K t0: 480, 897, t1: 3125, 2413, t2: 2589, 3003, t3: 2276, 3884). (B) Primäre neutrophile Granulozyten wurden einer Färbung nach Nicoletti unterzogen und im Durchflusszytometer analysiert, um fragmentierte DNA subgenomischer Größe nachzuweisen, die im Laufe der Apoptose auftritt. (C) Neutrophile Granulozyten wurden mit 7AAD gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht, um den Verlust der Membranintegrität als spätes Apoptoseereignis zu quantifizieren. Links ist je ein repräsentatives Beispiel gezeigt (grau gefüllt: Hintergrundfluoreszenz, graue Linie: t0, gepunktete Linie: t1, gestrichelte Linie: t2, schwarze Linie: t3), rechts sind die kumulativen Daten dargestellt (graue Punkte: gesunde Kontrollen, blaue Punkte: Patienten mit SLE).

CD86, und HLA-DR stärker exprimiert, ebenso nimmt die Oberflächen-Expression von CD14, CD31, CD11b und CD11c zu. Schließlich produzieren differenzierte U937-Zellen nach Stimulation mit LPS konzentrationsabhängig pro-inflammatorische Zytokine wie TNF (Abb. 5B). Auf Grund dieser Ergebnisse wurden U937-Zellen als DC-Modell in Kokultur-Experimenten mit apoptotischen Zellen eingesetzt.

Als interner Standard wurden Jurkat T-Zellen (J16) verwendet, in denen durch Behandlung mit UV-C (256 nm) Apoptose induziert wurde. Vier Stunden nach Bestrahlung weisen sie ein frühes Stadium der Apoptose auf (Abb. 5C). In diesem Zustand wurden sie mit U937-Zellen kokultiviert.

Bei den durchgeführten Experimenten wurden U937-Zellen mit apoptotischen neutrophilen Granulozyten aus Patienten mit SLE oder gesunden Kontrollen für drei Stunden vorinkubiert und anschließend mit LPS stimuliert. Um die Aktivierung der U937-Zellen zu messen, wurde die TNF-Sekretion mittels ELISA bestimmt (Abb. 6A).

Es lässt sich beobachten, dass die Kokultur von apoptotischen neutrophilen Granulozyten zu einer verminderten Sekretion von TNF führt (Abb. 6B). Dieser suppressive Effekt fällt mit zunehmender Aktivierung der U937-Zellen schwächer aus. Im Vergleich sind apoptotische neutrophile Granulozyten von Patienten mit SLE in der Lage, U937-Zellen zu supprimieren, ähnlich wie neutrophile Granulozyten von gesunden Kontrollen (Abb. 6B). Die Mediane der Stimulation liegen bei 58 % für gesunde Kontrollen und 54 % für Patienten mit SLE. Unter statistischen Gesichtspunkten lässt sich kein signifikanter Unterschied feststellen (p-Wert K *vs.* SLE: 0,0789). Der Median der Stimulation nach Kokultur mit apoptotischen Jurkat T-Zellen, die als interne Kontrolle verwendet wurden, liegt bei 56 %. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass apoptotische neutrophile Granulozyten von Patienten mit SLE eine vergleichbare Fähigkeit zur Hemmung von U937-Zellen aufweisen. Diesbezüglich liegt also kein zellintrinsischer Defekt der neutrophilen Granulozyten von Patienten mit SLE vor.

3.3 Primäre DC von Patienten mit SLE weichen im Bezug auf ihre Stimulierbarkeit durch Gefahrensignale nicht von DC aus gesunden Kontrollen ab

Da apoptotische neutrophile Granulozyten von Patienten mit SLE weder in ihrem Apoptoseverhalten noch in ihrer Fähigkeit zur Suppression von U937-Zellen Unter-

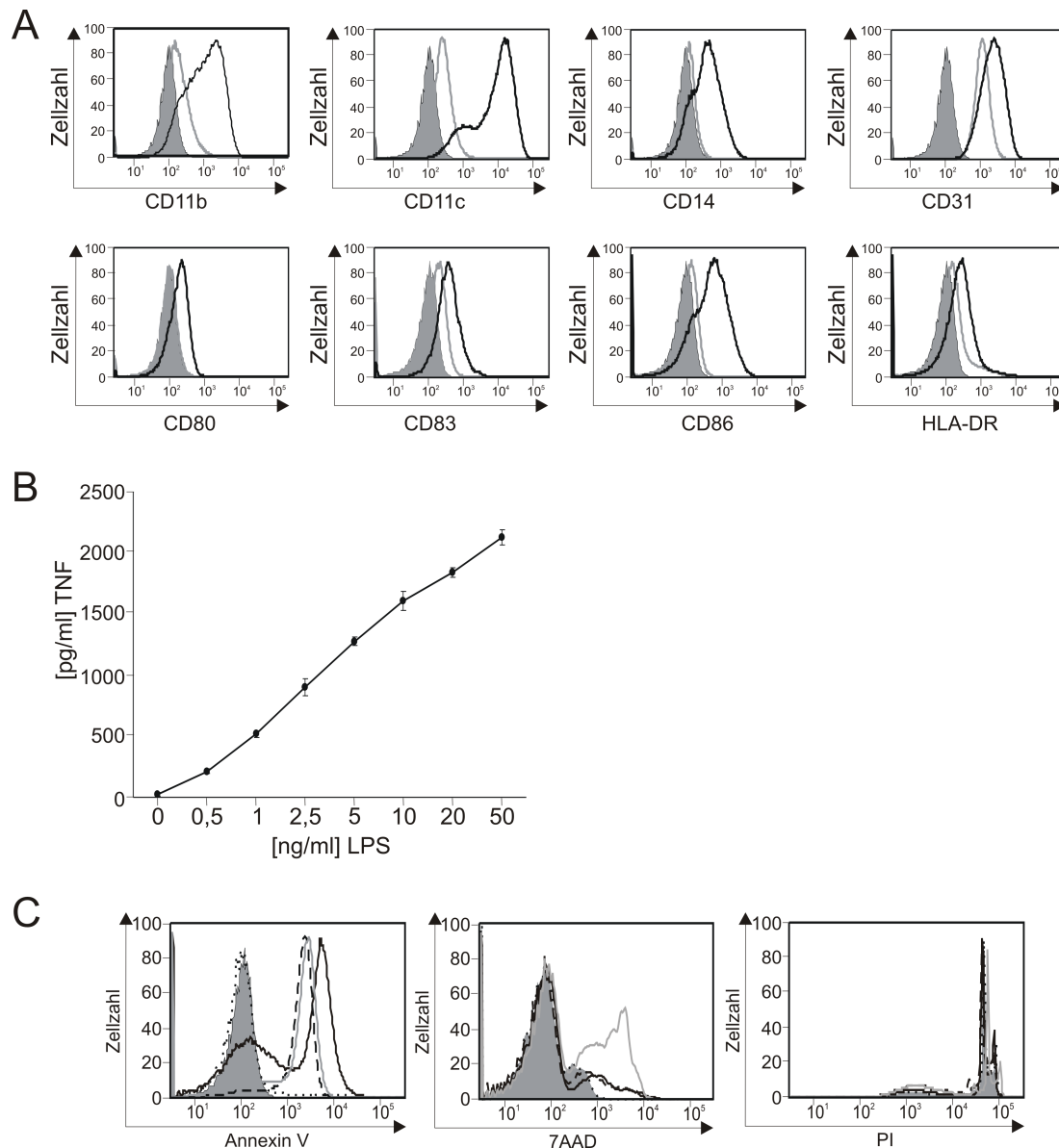


Abbildung 5: DC-ähnliche Differenzierung der monozytischen Zelllinie U937. (A) Zellen der monozytischen Zelllinie U937 wurden für drei Tage mit PMA differenziert und dann mit 5 ng/ml LPS stimuliert. Nach 48 Stunden wurden die stimulierten Zellen bzw. unstimulierte Zellen als Kontrolle mit Antikörpern gegen CD11b, CD11c, CD14, CD31, CD80, CD83, CD86 und HLA-DR gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (graue Füllung: Isotypkontrolle, graue Linie: Tag 5 ohne Stimulation, schwarze Linie: Tag 5 mit Stimulation an Tag 3). (B) U937-Zellen wurden an Tag 3 mit unterschiedlichen Konzentrationen LPS stimuliert, und die TNF-Sekretion wurde an Tag 4 mittels ELISA quantifiziert.

schiede zu neutrophilen Granulozyten von gesunden Kontrollen aufweisen, besteht die Möglichkeit, dass DC von Patienten mit SLE auf Grund eines abnormalen Verhaltens sich nicht supprimieren lassen. Daher wurde getestet, ob die Stimulierbarkeit der DC von Patienten mit SLE verändert ist. Wie bereits in Unterkapitel 3.2 erwähnt, hängt die Supprimierbarkeit von U937-Zellen vom Grad ihrer Aktivierung ab, wobei starke Aktivierung den suppressiven Effekt aufheben kann. Dies gilt auch für unreife DC, die aus

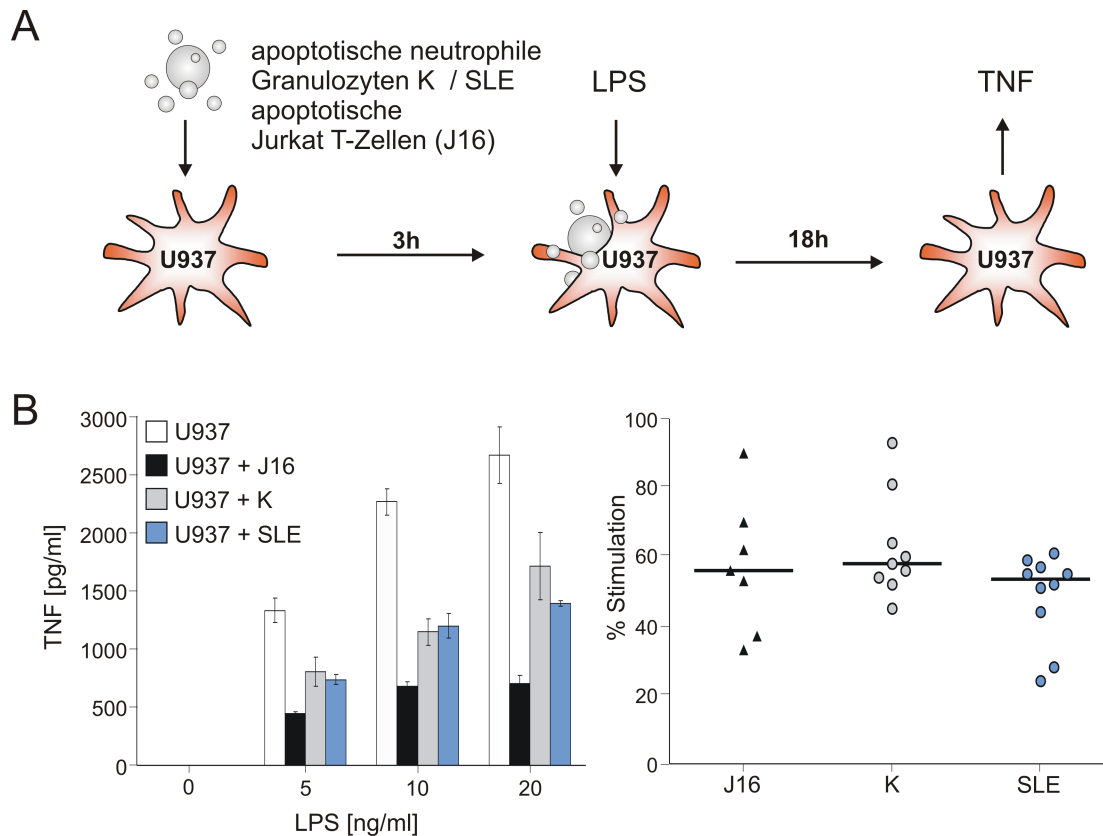


Abbildung 6: Supprimierbarkeit von U937-Zellen durch apoptotische neutrophile Granulozyten. (A) Schematische Darstellung des Experiments: Apoptotische neutrophile Granulozyten von Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen (K) wurden mit DC kokultiviert, um die Suppression LPS-induzierter Stimulation durch apoptotische Zellen zu testen. Apoptotische Jurkat T-Zellen (J16) wurden als interne Kontrolle mitgeführt. (B) U937-Zellen wurden nach dem in A gezeigten Schema mit apoptotischen neutrophilen Granulozyten oder J16 kokultiviert, 18 h später wurde die Sekretion von TNF im ELISA gemessen. links: repräsentatives Ergebnis, rechts: kumulative Daten für eine Stimulation mit 5 ng/ml LPS. Die TNF-Sekretion nach Stimulation ohne Kokultur wurde jeweils auf 100 % gesetzt. Die Linien repräsentieren den Median der Population.

monozytischen Vorläuferzellen *in vitro* differenziert wurden (Daten nicht gezeigt). Eine verstärkte Reaktion auf Aktivierungssignale könnte damit eine schwächere Toleranzinduktion *in vivo* erklären. Daher wurden *in vitro* differenzierte DC mit ansteigenden LPS-Konzentrationen stimuliert und die Produktion von TNF im ELISA gemessen. Ein Unterschied in der TNF-Produktion zwischen DC von Patienten mit SLE und DC von gesunden Kontrollen ist jedoch nicht nachweisbar (Abb. 7A). Die Variabilität der Messwerte der einzelnen Spender ist bei diesem Experiment sehr hoch; dies ist auch von anderen Gruppen beschrieben worden (Sampaio et al. 1991). Die Streuung hat jedoch keinen Einfluss auf die Mediane der Populationen, die im Vergleich keine signifikanten Unterschiede zeigen.

Eventuelle Unterschiede in der Supprimierbarkeit von DC von Patienten mit SLE im Vergleich zu gesunden Kontrollen müssen sich jedoch nicht zwangsläufig in der Sekre-

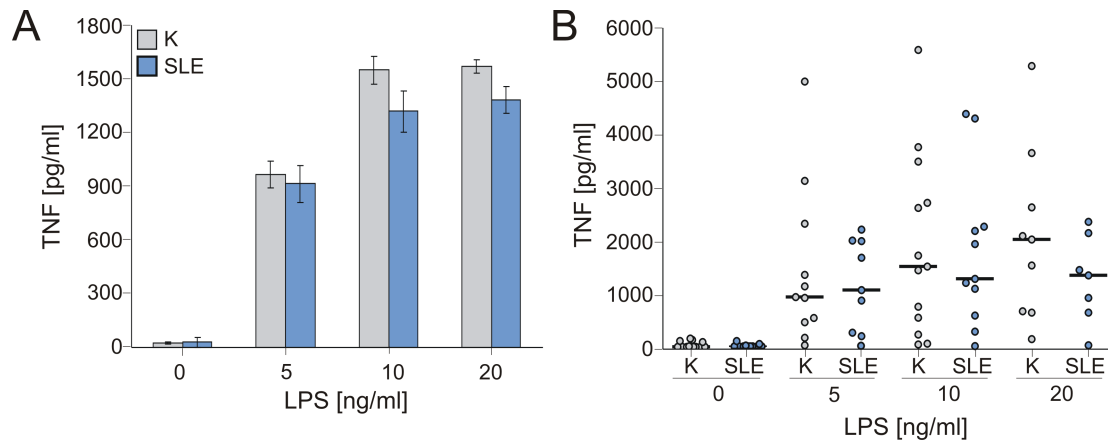


Abbildung 7: Stimulierbarkeit primärer DC. (A) Primäre DC wurden mit der angegebenen LPS-Konzentration stimuliert. Anschließend wurde die Sekretion von TNF mittels ELISA gemessen. Links: ein representatives Ergebnis, rechts: kumulative Daten (blau: Patienten mit SLE, grau: gesunde Kontrollen (K)).

tion pro-inflammatorischer Zytokine widerspiegeln. Um zu prüfen, ob sich Unterschiede auf anderer Ebene finden, wurde die Expression kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche der DC untersucht. Ein exemplarisches Ergebnis ist in Abbildung 8 dargestellt. Die Expression von HLA-DR, CD86 und CD83 steigt nach Stimulation an. Eine Quantifizierung ergibt auch hier keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen DC aus Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen (Abb. 8B). Daraus lässt sich schließen, dass das Verhalten der DC hinsichtlich TNF-Sekretion und Expression kostimulatorischer Marker zwischen Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen vergleichbar ist.

3.4 Die Supprimierbarkeit durch apoptotische Zellen ist bei DC von Patienten mit SLE im Vergleich zu gesunden Kontrollen nicht vermindert

Da sich DC von Patienten mit SLE in vergleichbarem Maße wie DC von gesunden Kontrollen stimulieren lassen, stellte sich die Frage, ob sie sich auch in gleichem Maße durch apoptotische Zellen supprimieren lassen. Um dies zu überprüfen wurde ein experimentelles System verwendet, in dem primäre humane DC mit apoptotischen Jurkat T-Zellen für drei Stunden kokultiviert wurden, um nach anschließender LPS-Stimulation die TNF-Sekretion mittels ELISA zu messen (Abb. 9A).

Apoptotische Jurkat T-Zellen sind in der Lage, die TNF-Sekretion nach Aktivierung

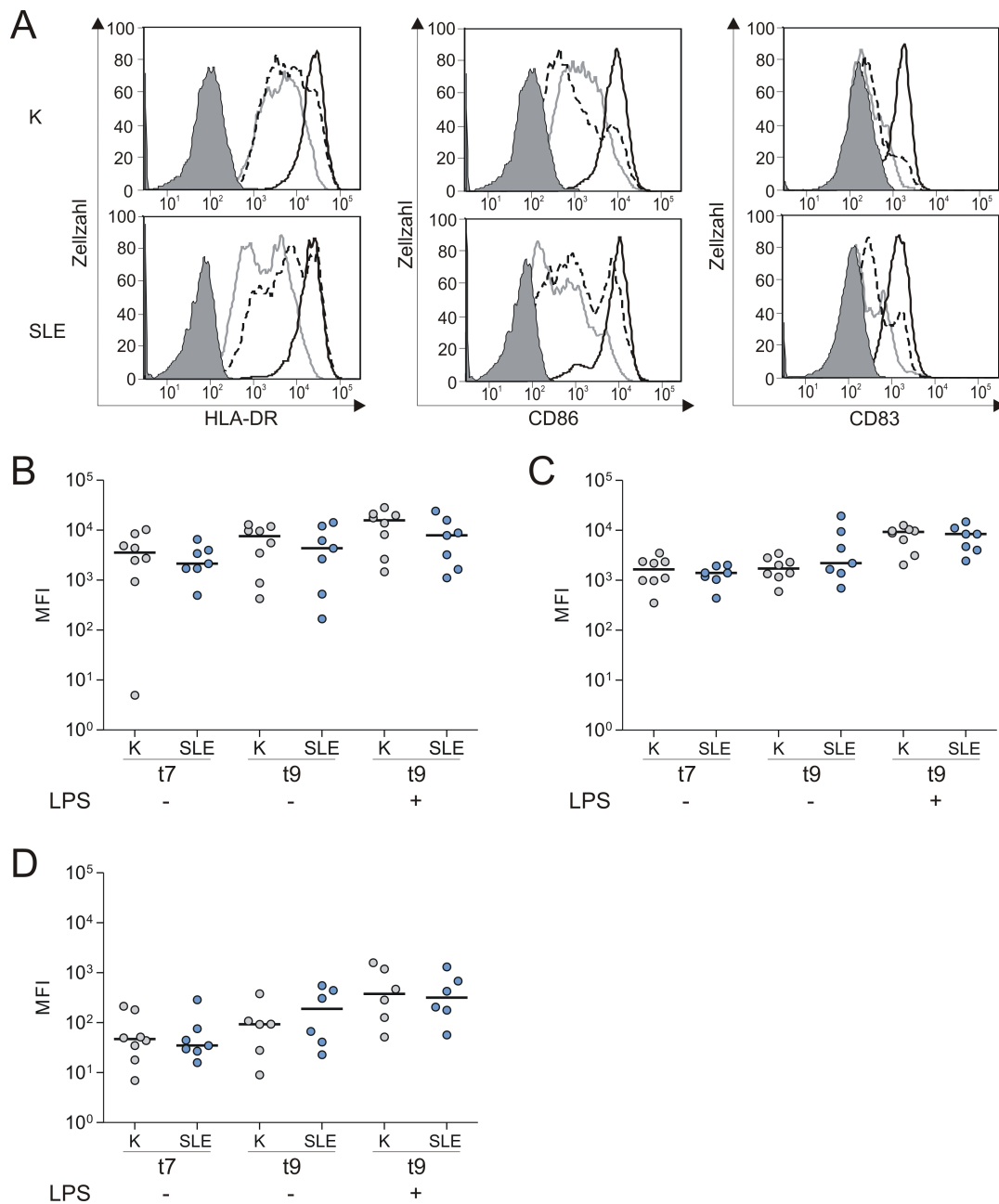


Abbildung 8: Expression von Aktivierungsmarkern auf der Oberfläche von DC nach Stimulation. (A) Repräsentatives Ergebnis: *In vitro* gereifte DC aus monozytischen Vorläuferzellen wurden mit 5 ng/ml LPS stimuliert und anschließend mit Antikörpern gegen HLA-DR, CD86 und CD83 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. (Grau gefüllt: Isotypkontrolle, graue Linie: Tag 7 unstimuliert, gestrichelte Linie: Tag 9 unstimuliert, schwarze Linie: Tag 9 stimuliert mit 5 ng/ml LPS an Tag 7.) (B-D) Kumulative Daten für HLA-DR (B), CD86 (C) und CD83 (D) (blau: Patienten mit SLE, grau: gesunde Kontrollen).

der DC zu vermindern (Abb. 9 B). Die kumulative Auswertung ergibt, dass der Median der TNF-Sekretion bei supprimierten DC von gesunden Kontrollen bei 56 % liegt und bei DC von Patienten mit SLE bei 70 % (nach einer Stimulation mit 5 ng/ml LPS). Dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant (p-Wert: 0,9654). Auch die Werte für 10 und 20 ng/ml LPS zeigen keine statistisch signifikanten Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

Auch in diesem Experiment wird deutlich, dass die Suppression der DC von der Stärke ihrer Aktivierung abhängt und der suppressive Effekt durch eine starke Aktivierung der DC aufgehoben werden kann (Abb. 9C). Das heißt, dass bei einer schwachen Aktivierung der DC der suppressive Effekt und damit die verminderte Sekretion proinflammatorischer Moleküle stärker ausfällt als bei einer starken Aktivierung. Wenn die Aktivierung eine bestimmte Grenze überschreitet, tritt jedoch kein suppressiver Effekt mehr auf.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass primäre DC von Patienten mit SLE gegenüber DC von gesunden Kontrollen keine signifikanten Unterschiede in ihrer Supprimierbarkeit durch apoptotische Zellen zeigen. Ein zellintrinsischer Defekt lässt sich nicht nachweisen.

3.5 Apoptotische Zellen von Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen zeigen keine Unterschiede in der Oberflächenexpression von Annexin 1

In der Abteilung von Prof. Krammer wurde nachgewiesen, dass das Protein Annexin 1 während der Apoptose externalisiert wird und dass es die Aktivierbarkeit humaner DC hemmt (Weyd 2006; Dörner 2007). Daher stellte sich die Frage, ob dieses Molekül bei Patienten mit SLE ein abweichendes Verhalten aufweist. Dabei könnten Expression oder Lokalisation verändert sein, oder der supprimierende Effekt könnte durch eine Mutation vermindert oder aufgehoben werden. Um dies zu untersuchen, wurde die Oberflächenexpression von Annexin 1 auf apoptotischen neutrophilen Granulozyten mittels Durchflusszytometrie quantifiziert und im zeitlichen Verlauf beobachtet. In Abbildung 10A ist exemplarisch das Ergebnis einer solchen Messung über den Zeitraum von vier Tagen dargestellt. Die kumulativen Daten zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen apoptotischen neutrophilen Granulozyten von Patienten mit SLE und

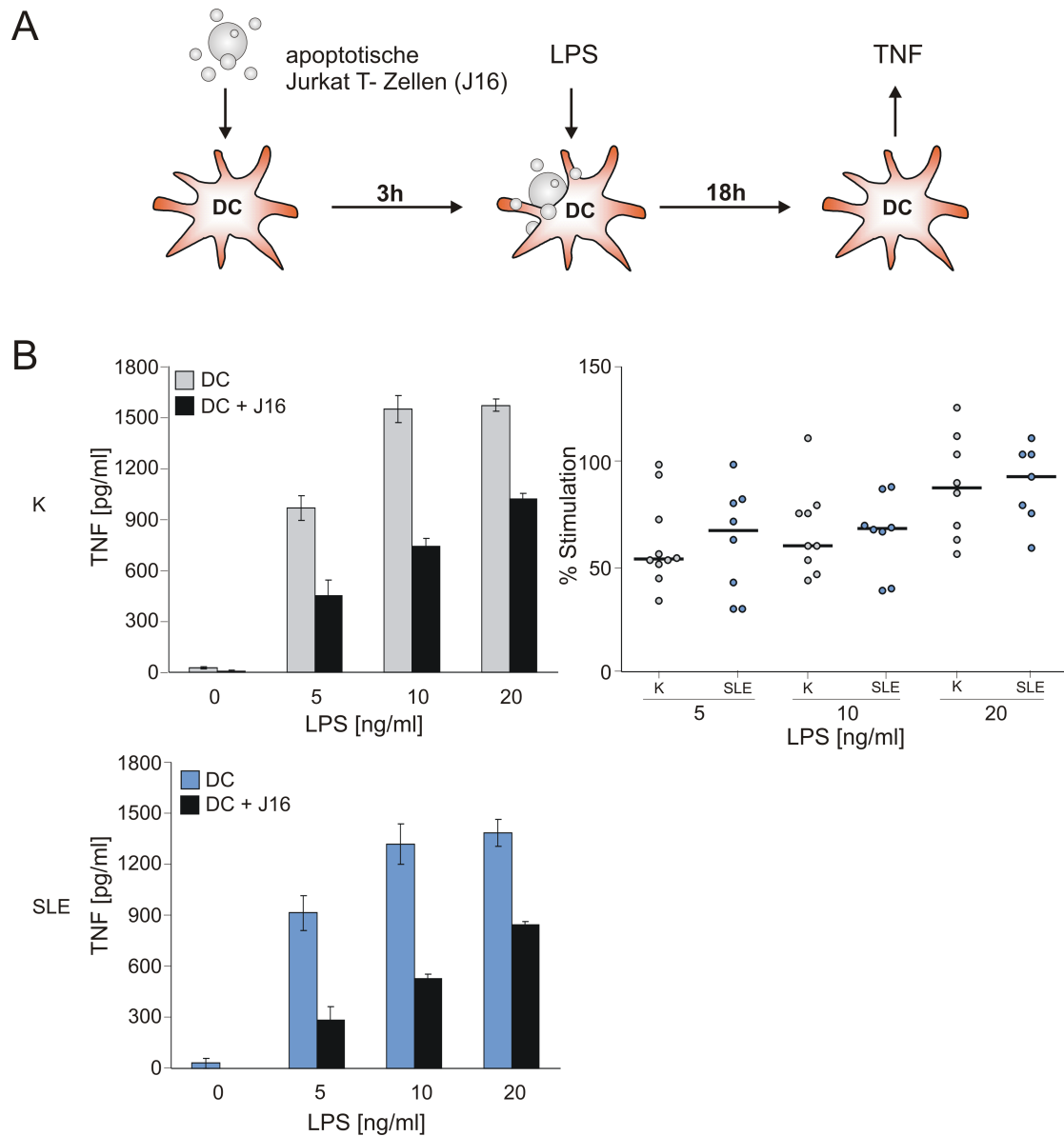


Abbildung 9: Suppressiver Effekt apoptotischer Zellen auf DC. (A) Schematische Darstellung des Experiments: *In vitro* differenzierte DC aus monozytischen Vorläuferzellen wurden mit apoptotischen Jurkat T-Zellen (J16) kokultiviert, um anschließend die Suppression LPS-induzierter Sekretion von TNF mittels ELISA zu quantifizieren. (B) Nachweis UV-C-induzierter Apoptose in Jurkat T-Zellen (J16) nach Bestrahlung mit 50 mJ/cm². (Grau gefüllt: Hintergrundfluoreszenz, gepunktete Linie: lebende J16, schwarze Linie: J16 2h nach UV-Induktion, gestrichelte Linie: J16 4h nach UV-Induktion, graue Linie: J16 6h nach UV-Induktion.) (C) Kokultorexperiment nach dem in (A) gezeigten Schema. Links: jeweils ein repräsentatives Ergebnis für einen Patienten mit SLE und eine gesunde Kontrolle, rechts: kumulative Daten, (blau: Patienten mit SLE, grau: gesunde Kontrollen). Stimulierte DC ohne Kokultur wurden auf 100 % gesetzt und das Ergebnis der Kokultur prozentual darauf bezogen.

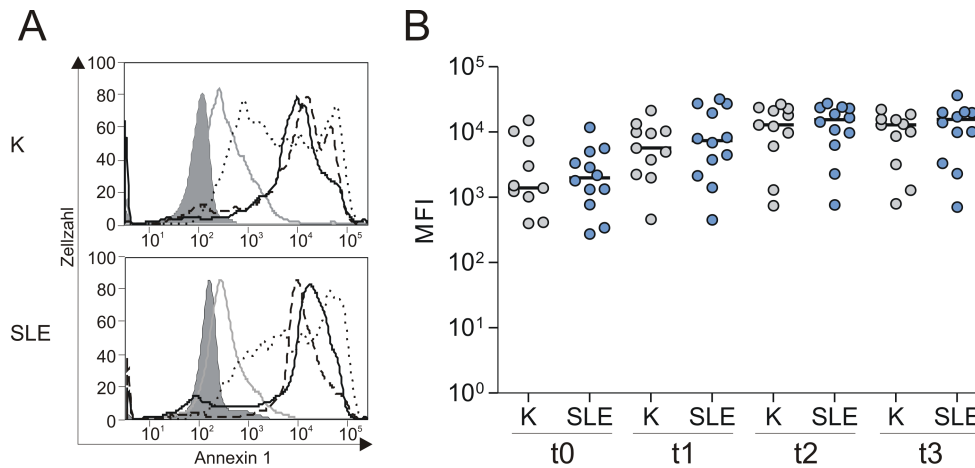


Abbildung 10: Expression von Annexin 1 auf der Oberfläche apoptotischer neutrophiler Granulozyten. (A) Repräsentatives Ergebnis der durchflusszyotmetrischen Analyse von Annexin 1 auf der Oberfläche apoptotischer neutrophiler Granulozyten von Patienten mit SLE (SLE) oder gesunden Kontrollen (K) (grau gefüllt: Hintergrundfluoreszenz, graue Linie: Tag 0, gepunktete Linie: Tag 1, gestrichelte Linie: Tag 2, schwarze Linie: Tag 3) (B) Kumulatives Ergebnis (blau: Patienten mit SLE, grau: gesunde Kontrollen).

gesunden Kontrollen bezüglich der Menge und dem zeitlichem Verlauf der Annexin 1 Externalisierung (Abb. 10B). Daraus lässt sich schließen, dass Expression und Externalisierung von Annexin 1 bei neutrophilen Granulozyten von Patienten mit SLE nicht verändert sind. Da die apoptotischen neutrophilen Granulozyten von Patienten mit SLE im Vergleich zu gesunden Kontrollen kein unterschiedliches Verhalten in der Suppression aufweisen (siehe Abb. 6B), erscheint ein veränderter Einfluss auf die Suppression von DC durch Mutation von Annexin 1 unwahrscheinlich.

3.6 Etablierung eines Nachweissystems für Antikörper gegen Annexin 1 im Serum

Autoantikörper spielen eine große Rolle in der Pathogenese des SLE. Bereits vor einigen Jahren wurde gezeigt, dass im Serum von Patienten mit SLE Antikörper gegen verschiedene Annexine auftreten (Bastian et al. 1994; Goulding et al. 1989). Bei einigen Patienten mit SLE wurden Antikörpertiter festgestellt, die über denen der Vergleichskohorte gesunder Kontrollen lagen. In diesem Zusammenhang stellte sich die Frage, ob die Antikörper in der Lage sind, an Annexin 1 auf der Oberfläche apoptotischer Zellen zu binden und dadurch den Effekt von Annexin 1 zu blockieren. Zudem könnten Antikörper gegen Annexin 1 ein diagnostisches Hilfsmittel darstellen und das Spektrum der Laboruntersuchungen bei dieser Erkrankung erweitern. Da keine kommerziellen

Systeme zum Nachweis von Annexin 1 zur Verfügung stehen, musste ein Nachweissystem für Antikörper gegen Annexin 1 etabliert werden. Dazu wurden verschiedene Formen eines ELISA getestet (Daten nicht gezeigt). Ein ELISA mit einer direkten Bindung von rekombinantem Annexin 1 an die ELISA-Platte, nachfolgender Inkubation mit humanen Seren und anschließender Detektion mit gegen humanes IgG gerichteter, an Meerettich-Peroxidase gebundener Antikörper zeigte die besten Ergebnisse. Um die Qualität des ELISA zu überprüfen, wurden Seren von Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen sowohl im ELISA, als auch in der Immunopräzipitation von aufgereinigtem Annexin 1 getestet. Die nachgewiesenen Mengen an Antikörpern, die gegen Annexin 1 gerichtet sind, sind vergleichbar (Abb. 11A). Als Negativkontrolle wurden 56 Seren von gesunden Kontrollen verwendet. Über die Häufigkeitsverteilung der Kontrollgruppe wurde eine untere Testgrenze bei 95 % der Population bestimmt (Abb. 11B). Werte, die über dieser Grenze liegen, werden als positiv angesehen. Danach wurden Seren von Patienten mit SLE analysiert und ein Serum, das sich als stark positiv erwies, als positive Kontrollreferenz für alle nachfolgenden Tests verwendet. Um einen Überblick über das Verhältnis von positiven zu negativen Patientenseren zu erhalten, wurde eine Gruppe von 42 Patienten mit SLE untersucht (Abb. 11C). Von dieser Gruppe zeigen 12 Seren ein positives Testergebnis. Zum Vergleich wurden 65 Seren von Patienten mit kutanem Lupus erythematodes (engl.: cutaneous lupus erythematosus = CLE) eingeschlossen. Beim CLE handelt es sich um eine nicht systemische Erkrankung, die sich weitgehend auf die Haut beschränkt. Die Abgrenzung von SLE und CLE erfolgt mit Hilfe der ACR-Kriterien. In den ACR-Kriterien ist die Haut als von der Krankheit betroffenes Organ durch vier Kriterien stark gewichtet. Dieser Umstand kann dazu führen, dass Patienten mit CLE durch das Vorhandensein von unterschiedlichen Kriterien der Haut fälschlicherweise als Patienten mit SLE eingestuft und damit überbewertet werden (Kuhn et al. 2007).

12 von 42 (29 %, exakte Vertrauensgrenze (VG): 15,72 %-44,58 %) Patienten mit SLE zeigen ein positives Ergebnis für Autoantikörper gegen Annexin 1, während dies nur auf 7 von 65 (11 %, VG: 4,44 %-20,94 %) Patienten mit CLE zutrifft. 3 von 56 (5 %, VG: 1,12 %-14,87 %) gesunde Kontrollen sind positiv für Autoantikörper gegen Annexin 1. Daraus ergibt sich bei einer Spezifität (Wahrscheinlichkeitsmaß, Gesunde richtig zu erfassen) von 95 % eine Sensitivität (Wahrscheinlichkeitsmaß, Kranke richtig zu erfassen) des Tests von 29 % für SLE und von 11 % für CLE, sowie ein positiver Vorhersagewert (Wahrscheinlichkeit, dass eine Person mit positivem Test auch wirklich

krank ist) von 80 % für SLE und 70 % für CLE. Der negative Vorhersagewert (Wahrscheinlichkeit, dass eine Person mit negativem Testergebnis auch wirklich gesund ist) liegt für SLE bei 76 % und für CLE bei 48 %. Zusätzlich wurde eine Validierung der Experiment-zu-Experiment-Abweichungen durchgeführt, indem auf jeder Platte 4 Kontrollseren mitgeführt wurden. Der Variationskoeffizient, der ein Maß für die Inter-Experiment-Schwankungen ist, liegt bei 12,2 %. Der Test gewährleistet damit einen kleinen Schwankungsbereich und ein hohes Maß an Spezifität.

Aus den Ergebnissen lässt sich schließen, dass das Vorhandensein von anti-Annexin 1 Antikörpern ein besseres Vorhersagekriterium für SLE als für CLE ist, da mit nur 11 % ein sehr geringer Anteil der Patienten mit CLE dieses Kriterium erfüllt, im Vergleich zu 29 % bei Patienten mit SLE. In Abbildung 11B kann man erkennen, dass nicht nur die Anzahl der positiven Seren für Patienten mit SLE höher liegt, sondern dass sich auch die Mediane von SLE und CLE signifikant vom Median der Seren gesunder Kontrollen unterscheiden (SLE *vs.* CLE: p -Wert=0,0303, SLE *vs.* K: p -Wert<0,0001, CLE *vs.* K: p -Wert<0,0001).

3.7 Antikörper aus dem Serum von Patienten mit SLE binden an apoptotische Jurkat T-Zellen

Seren von Patienten mit SLE enthalten Antikörper gegen nukleäre Antigene, gegen doppelsträngige DNA und, wie in Abbildung 11 gezeigt, teilweise auch gegen Annexin 1. Die Produktion von Antikörper gegen Annexin 1 könnte funktionelle Relevanz haben, indem z.B. Antikörper gegen Annexin 1 die Funktion von Annexin 1 auf der Oberfläche apoptotischer Zellen blockieren und damit zu einer verminderten suppressiven Wirkung apoptotischer Zellen führen könnten.

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Antikörpern gegen Annexin 1 und verminderter Suppression der DC zu untersuchen, wurde analysiert, ob Antikörper aus dem Serum in der Lage sind, an apoptotische Zellen zu binden. Dazu wurden apoptotische Jurkat T-Zellen mit Seren von gesunden Kontrollen und Patienten mit SLE inkubiert. Der Anteil der gebundenen Antikörper wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Um sicherzustellen, dass die Antikörper die apoptotischen Jurkat T-Zellen und nicht lebenden Zellen binden, wurden die Zellen zusätzlich mit Annexin V und 7AAD gefärbt und die entsprechenden Populationen im Durchflusszytometer getrennt

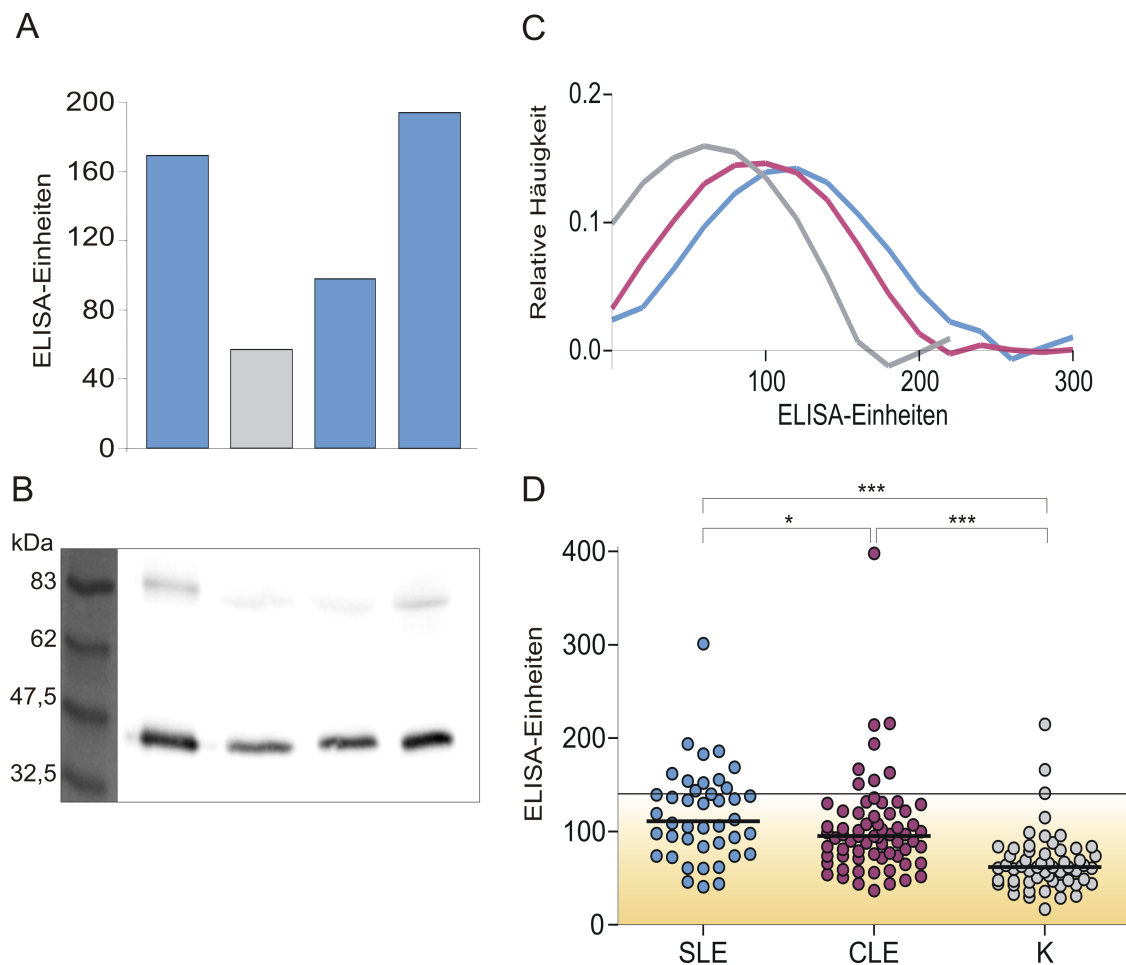


Abbildung 11: Nachweis von Autoantikörpern gegen Annexin 1 im Serum. (A) Nachweis von Antikörpern gegen Annexin 1 im Serum (oben: ELISA-Ergebnis, grau: gesunde Kontrolle, blau: Patienten mit SLE; unten: Westernblot der Immunopräzipitation von gereinigtem Annexin 1 der selben Seren) (B) Häufigkeitsverteilung der ELISA-Ergebnisse zum Nachweis von Autoantikörpern gegen Annexin 1 im Serum (grau: K, rot: CLE, blau: SLE). (C) Kumulatives Ergebnis des ELISA (blau: Patienten mit SLE, rot: CLE-Patienten, grau: gesunde Kontrollen). Die untere Testgrenze für die Positivität des Tests wurde bei 95 % der Verteilung des anti-Annexin 1 Antikörpergehalts der Seren gesunder Kontrollen gesetzt. (*: p-Wert=0,0303, ***: p-Wert<0,0001)

voneinander betrachtet. Dabei ergab sich, dass die Seren in keinem Fall an lebende Jurkat T-Zellen binden (Abb.12A). Im Gegensatz zu den Seren von Patienten mit SLE binden die Seren der gesunden Kontrollen auch nicht an apoptotische Jurkat T-Zellen. Die Stärke der Bindung ist jedoch unabhängig von dem Ergebnis im Annexin 1 ELISA (Abb.12B). Bei differenzierter Betrachtung früh- und spätapoptotischer Zellen kann man erkennen, dass eine größere Fraktion von Antikörpern aus dem Serum von Patienten mit SLE an spätapoptotische Zellen bindet, die ihre Membranintegrität bereits verloren haben (Daten nicht gezeigt). Dies ist nicht weiter verwunderlich, da bei allen untersuchten Patienten anti-dsDNA Antikörper und ANA nachgewiesen wurden.

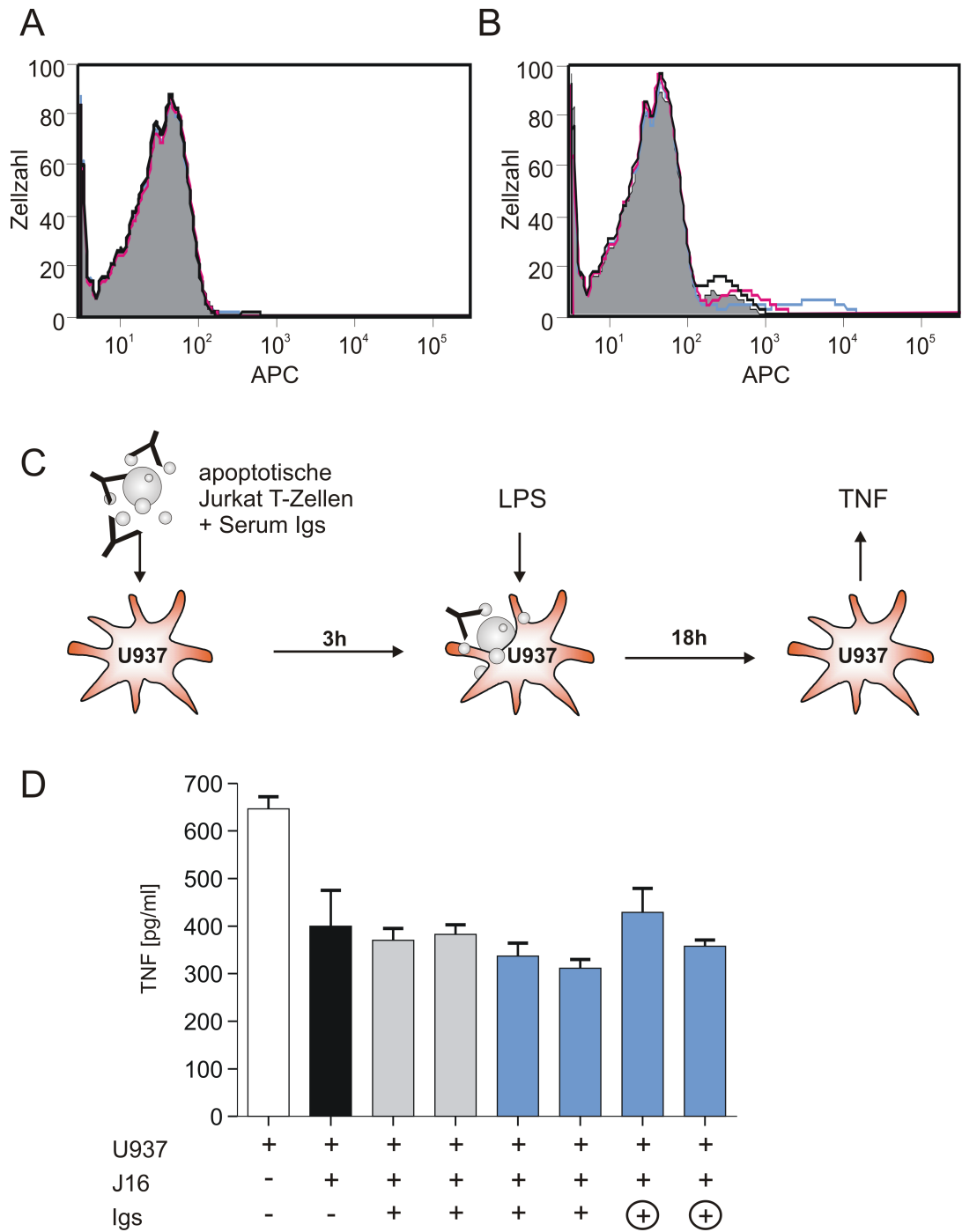


Abbildung 12: Antikörper aus den Seren von Patienten mit SLE binden an apoptotische Jurkat T-Zellen. (A) Durchflusszytometrische Analyse lebender und apoptotischer J16 (B) nach der Inkubation mit Protein A-aufgereinigtem Serum ($30 \mu\text{g}/10^6$ J16, grau gefüllt: Isotypkontrolle; schwarz: gesunde Kontrolle, blau: Patient mit SLE, negativ im ELISA für Annexin 1; pink: Patient mit SLE, positiv im ELISA für Annexin 1). (C) Versuchsaufbau: Zugabe von Protein A-aufgereinigten Serumkomponenten zu J16, danach Entfernung des ungebundenen Anteils durch Waschen, Kokultur mit U937-Zellen und anschließender Messung von TNF-Sekretion mittels ELISA. (D) Repräsentative Ergebnisse des in (C) beschriebenen Versuchs (weiß: U937 ohne Kokultur, schwarz: Kokultur mit unbehandelten J16, grau: Seren von gesunden Kontrollen, blau: Seren von Patienten mit SLE). Seren, die im ELISA als positiv für Autoantikörper gegen Annexin 1 gewertet wurden, sind mit einem Kreis gekennzeichnet.

3.8 Antikörper haben einen geringen Einfluss auf die Supprimierbarkeit von U937-Zellen

Antikörper von Patienten mit SLE können an apoptotische Zellen binden (Abb.12B). Im Folgenden wurde näher untersucht, ob diese Bindung auch funktionelle Konsequenzen bei der Suppression von DC hat. Um den Einfluss der Seren vergleichen zu können und den Effekt der Antikörper zu testen, wurde die Antikörperfraktion aus dem entsprechenden Serum über Protein A-Sepharose aufgereinigt. Eine derartige Antikörper-Präparation enthält auf Grund der Bindungseigenschaften von Protein A überwiegend Antikörper der Isotypen IgG1 und IgG2 sowie IgM, IgA und IgE, die mit niedrigerer Affinität gebunden werden.

Apoptotische Jurkat T-Zellen wurden mit der gleichen Menge von Antikörpern aus Seren von Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen vorinkubiert und in einem Kokulturrexperiment mit U937-Zellen eingesetzt, das unter den gleichen Bedingungen wie in 3.2 durchgeführt wurde (Abb. 12C). Die Antikörper beeinflussen die Suppression der U937-Zellen hinsichtlich der TNF-Produktion nur minimal (Abb.12D). Die Effekte lassen sich jedoch nicht eindeutig mit den serologischen Parametern (Vorhandensein von anti-dsDNA Antikörpern, ANA oder Antikörper gegen Annexin 1) in Zusammenhang bringen. Zudem sind die Antikörper nicht in der Lage, den suppressiven Effekt der apoptotischen Zellen aufzuheben.

Analoge Kokulturrexperimente wurden mit primären humanen DC durchgeführt. In diesen zeigen sich keine Effekte, die durch das Vorhandensein bestimmter Autoantikörper erklärt werden können, und im Vergleich zu den Experimenten mit U937-Zellen kann auch hier der suppressive Effekt der apoptotischen Zellen nicht aufgehoben werden (Daten nicht gezeigt). Insbesondere lässt sich weder mit U937-Zellen noch mit DC eine blockierende Funktion der Seren nachweisen, die für Annexin 1 Antikörper positiv getestet wurden.

3.9 Antikörper haben einen geringen Einfluss auf die Phagozytoserate

Um zu prüfen, ob die Antikörper aus Seren von Patienten mit SLE einen Einfluss auf die Phagozytoserate haben, wurden apoptotische Jurkat T-Zellen direkt nach der Apoptoseinduktion durch UV-C mit einem fluoreszierenden Membranfarbstoff gefärbt und kurz vor der Verwendung im Kokulturrexperiment mit aufgereinigter Antikörperfraktion des

entsprechenden Serums für 15 Minuten vorinkubiert. Die nicht gebundenen Bestandteile wurden durch Waschen entfernt. Diese Zellen wurden dann mit U937-Zellen oder primären DC kokultiviert. Als bestes Verhältnis zwischen Phagozyten und apoptotischen Zellen erwies sich ein Verhältnis von 1:1, da eine größere Anzahl apoptotischer Zellen im Verhältnis zu den Phagozyten die Aufnahme nicht weiter steigern kann (Daten nicht gezeigt). Im zeitlichen Verlauf konnte festgestellt werden, dass die Phagozytoserate bereits nach 15 Minuten ihr Maximum erreicht hat (Daten nicht gezeigt). Um eventuelle Unreinheiten der primären DC auszuschließen und die aufgenommenen Jurkat T-Zellen von den nicht aufgenommenen zu unterscheiden, wurden die Zellen nach dem Abstoppen der Reaktion mit an FITC gekoppelten Antikörpern gegen CD31 (U937-Zellen) bzw. gegen CD11b (DC) gefärbt. Jurkat T-Zellen sind für beide Moleküle negativ.

Dadurch lassen sich in der Auswertung der durchflusszytometrischen Daten die nicht phagozytierten Jurkat T-Zellen und die nicht phagozytierenden DC leicht unterscheiden, da sie jeweils nur für ein Fluorophor positiv sind (Abb. 13A). Bei Zellen, die positiv für beide Fluoreszenzen sind, handelt es sich um DC, die apoptotische Jurkat T-Zellen inkorporiert oder an ihre Membran angelagert haben (Abb. 13B). Als Kontrolle werden lebende J16 T-Zellen verwendet, die teilweise auch inkorporiert werden, aber zu einem weit geringeren Anteil als tote Zellen. Diese Aufnahme kann zum Teil mit einem geringen Anteil apoptotischer Zellen in der Kultur und zum anderen durch einen Anteil unspezifischer Phagozytose erklärt werden.

In diesen Experimenten lassen sich geringe Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Seren von Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen und im Vergleich zur ohne Serum behandelten Kontrolle erkennen. Diese Unterschiede sind in ihrem Ausmaß aber nicht signifikant und nicht ausreichend, um ein gestörtes Verhalten der DC zu postulieren, das zu einer verminderten Toleranzinduktion führen könnte *in vivo* (Abb. 13C).

3.10 Die Anzahl der Treg unterscheidet sich nicht in Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen

Die suppressiven Eigenschaften tolerogener DC zeigen sich nicht nur in einer Hemmung der Expression pro-inflammatorischer und in der Induktion anti-inflammatorischer Zytokine, sondern beinhalten auch ein verändertes Verhalten hinsichtlich der Interaktion

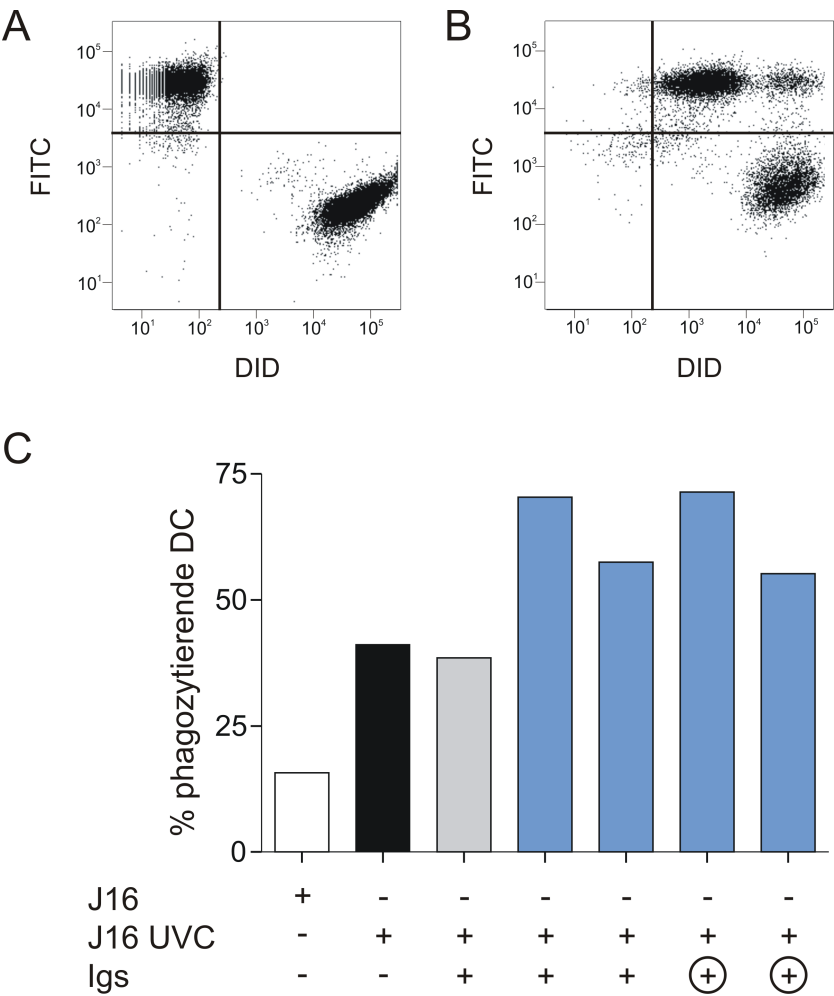


Abbildung 13: Antikörper aus dem Serum von SLE Patienten haben einen geringen Einfluss auf die Phagozytoserate. (A) Repräsentatives Ergebnis eines Phagozytoseexperiments. Dot-Blot vor Phagozytose (Phagozyten (FITC) und apoptotische Zellen (DID) lassen sich gut von einander trennen) (B) Dot-Blot nach 15 min Inkubation (doppelpositive Zellen (FITC und DID) repräsentieren phagozytierende Zellen)(C) Quantitatives Ergebnis eines Phagozytose-Experiments (weiss: Kokultur mit lebenden J16, schwarz: apoptotische J16 ohne Behandlung mit Serumkomponenten, grau: Serumkomponenten von gesunden Kontrollen, blau: Serumkomponenten von Patienten mit SLE). Seren, die im ELISA als positiv für Antikörper gegen Annexin 1 gewertet wurden, sind mit einem Kreis gekennzeichnet.

mit T-Zellen. Auf diese Weise können z.B. T-Zellen *in vivo* von tolerogenen DC zu Treg umgewandelt werden (Min et al. 2003). *In vitro* ist es aus technischen Gründen meistens schwierig, eine solche Umwandlung nachzuweisen.

Treg zeigen eine hohe Expression von CD25 auf der Oberfläche und eine intrazelluläre Expression des Transkriptionsfaktors FoxP3 (dem zur Zeit einzigen gut nachweisbaren Marker für Treg im humanen System). Zudem weisen Treg einen Phänotyp auf, der dem von Gedächtnis-T-Zellen ähnelt. Auf der Oberfläche lässt sich CD45RO als charakteristisches Molekül dieses Phänotyps nachweisen.

Ein Hinweis für eine gestörte Induktion von Treg durch DC in Patienten mit SLE wäre

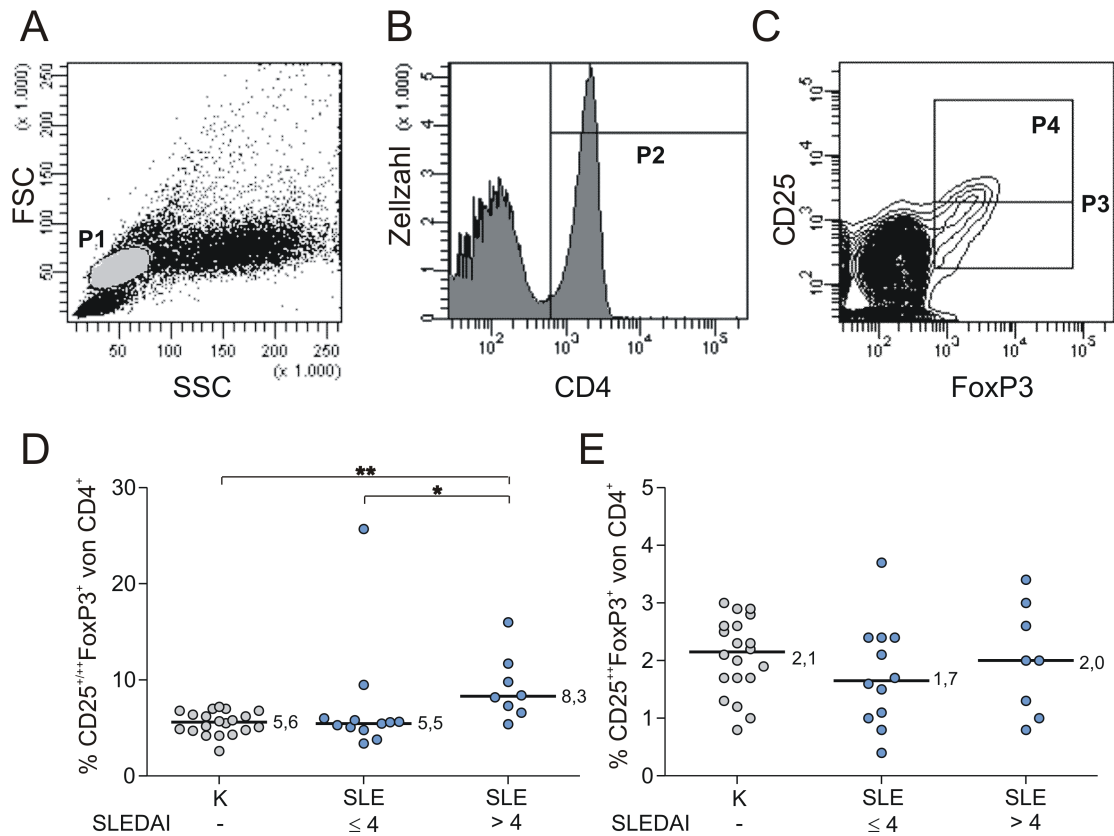


Abbildung 14: Quantifizierung von Treg im Blut von Patienten mit SLE. Beispiele für die Abgrenzung der einzelnen Populationen: (A) Lymphozytenpopulation, die T-Zellen enthält (P1), (B) CD4⁺ T-Zellen (P2), (C) FoxP3⁺CD25^{+/++} aus CD4⁺ (P3), bzw. FoxP3⁺CD25⁺⁺ aus CD4⁺ (P4). (D) Quantitativer Vergleich von FoxP3⁺CD25^{+/++}-Treg und FoxP3⁺CD25⁺⁺ Treg (E) (SLEDAI ≤ 4: SLE inaktiv, SLEDAI > 4: SLE aktiv, * p=0,0187, ** p=0,0012).

eine Reduktion der Anzahl von Treg im peripheren Blut. Um dies zu untersuchen, wurden Treg aus peripherem Blut von Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Dazu wurde zunächst die Population eingegrenzt, die T-Zellen enthält (P1, Abb. 14A). Dann wurden die CD4⁺ Zellen selektiert (P2, Abb. 14B) und nachfolgend aus diesen die FoxP3⁺ Zellen quantifiziert (P3, Abb. 14C), bzw. die Anzahl der FoxP3⁺CD25⁺⁺ bestimmt, indem die untere Grenze dieser Population über die Obergrenze für CD25 in der FoxP3⁻-Fraktion festgelegt wurde (P4, Abb. 14C). Durch diese Technik konnten aktivierte Tcon weitgehend ausgeschlossen werden, da diese zwar auch einen FoxP3⁺-Phänotyp haben, aber im Unterschied zu Treg CD25 schwächer und nur transient exprimieren.

Die Menge der FoxP3⁺CD25^{+/++} Treg ist vergleichbar zwischen den inaktiven Patienten mit SLE (SLEDAI ≤ 4; Median: 5,6 %) und den gesunden Kontrollen (Median: 5,5 %; Abb. 14D). Die aktiven Patienten zeigen eine signifikant erhöhte Anzahl dieser Zellen (Median: 8,3 %) gegenüber den beiden anderen Gruppen (K (gesunde Kon-

trollen) *vs.* SLE SLEDAI > 4: $p=0,0012$, SLE SLEDAI ≤ 4 *vs.* > 4: $p=0,0187$). In Bezug auf die Anzahl der FoxP3⁺CD25⁺⁺ Treg lassen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede nachweisen. Daher sprechen die Daten der Quantifizierung von Treg nicht dafür, dass eine Reduktion der Anzahl der Treg für die verminderte periphere Toleranz verantwortlich ist. Eine funktionale Veränderung der Treg wäre in diesem Falle möglich, konnte aber auf Grund des zu geringen Ausgangsmaterials an peripherem Blut nicht analysiert werden.

Um der Frage nachzugehen, ob Treg aus Patienten mit SLE durch veränderte phänotypische Eigenschaften zur Pathogenese von SLE beitragen können, wurden weitere Marker durchflusszytometrisch analysiert. CD45RO ist ein Molekül, das auf Gedächtnis-T-Zellen und auch auf Treg vermehrt gefunden wird. Naïve T-Zellen exprimieren dagegen die Isoform CD45RA auf der Oberfläche. Nach Aktivierung und durch den Einfluss von IL-2 wird CD45RA herunterreguliert und CD45RO wird vermehrt exprimiert. Unterschiede in der Expression dieses Moleküls würden auf eine veränderte Voraktivierung hindeuten. In den hier vorgestellten Experimenten wurde die Anzahl der CD45RO⁺ Zellen unter den CD4⁺FoxP3⁺CD25^{+/++} analysiert. Es zeigen sich jedoch keine Unterschiede in der Anzahl der Treg, die für diesen Marker positiv sind (Abb. 15A).

CD27 kann ebenfalls auf Gedächtnis-T-Zellen nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass CD27⁺ Treg einen suppressiven Phänotyp aufweisen (Koenen et al. 2005; Ruprecht et al. 2005). Für diesen Marker zeigen sich nur geringe quantitative Unterschiede. Die Mediane liegen bei 94,3 % für gesunde Kontrollen, 94,9 % für SLE mit SLEDAI ≤ 4 und 89,4 % für SLE mit SLEDAI >4 (Abb. 15B), so dass die Ergebnisse für CD45RO unterstrichen werden. Die Marker CD62L (L-Selektin) und CCR6 spielen eine entscheidende Rolle beim sogenannten „T-Zell-Homing“. Dabei werden im Fall von CCR6 T-Zellen durch Bindung der entsprechenden Liganden (CCL20 und β -Defensin) zu Entzündungsorten rekrutiert (Yamazaki et al. 2008; Kleinewietfeld et al. 2005). CD62L dirigiert die T-Zellen zu den Lymphknoten und wird nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors herunterreguliert (Ermann et al. 2005). In Bezug auf CD62L können keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Abb. 15C). CCR6 zeigt in der Gruppe der aktiven Patienten mit SLE einen signifikant höheren Wert im Vergleich zu den inaktiven Patienten mit SLE (Abb. 15D; $p=0,0312$). Dieser Unterschied lässt sich nicht in den Werten für diesen Marker in der Gruppe der Tcon (CD4⁺CD25⁻) finden (Abb. 15E). Dieses Ergebnis erscheint nicht verwunderlich, da bei Patienten mit SLE vermehrt Entzündungen auftreten und dadurch insgesamt eine größere Anzahl von

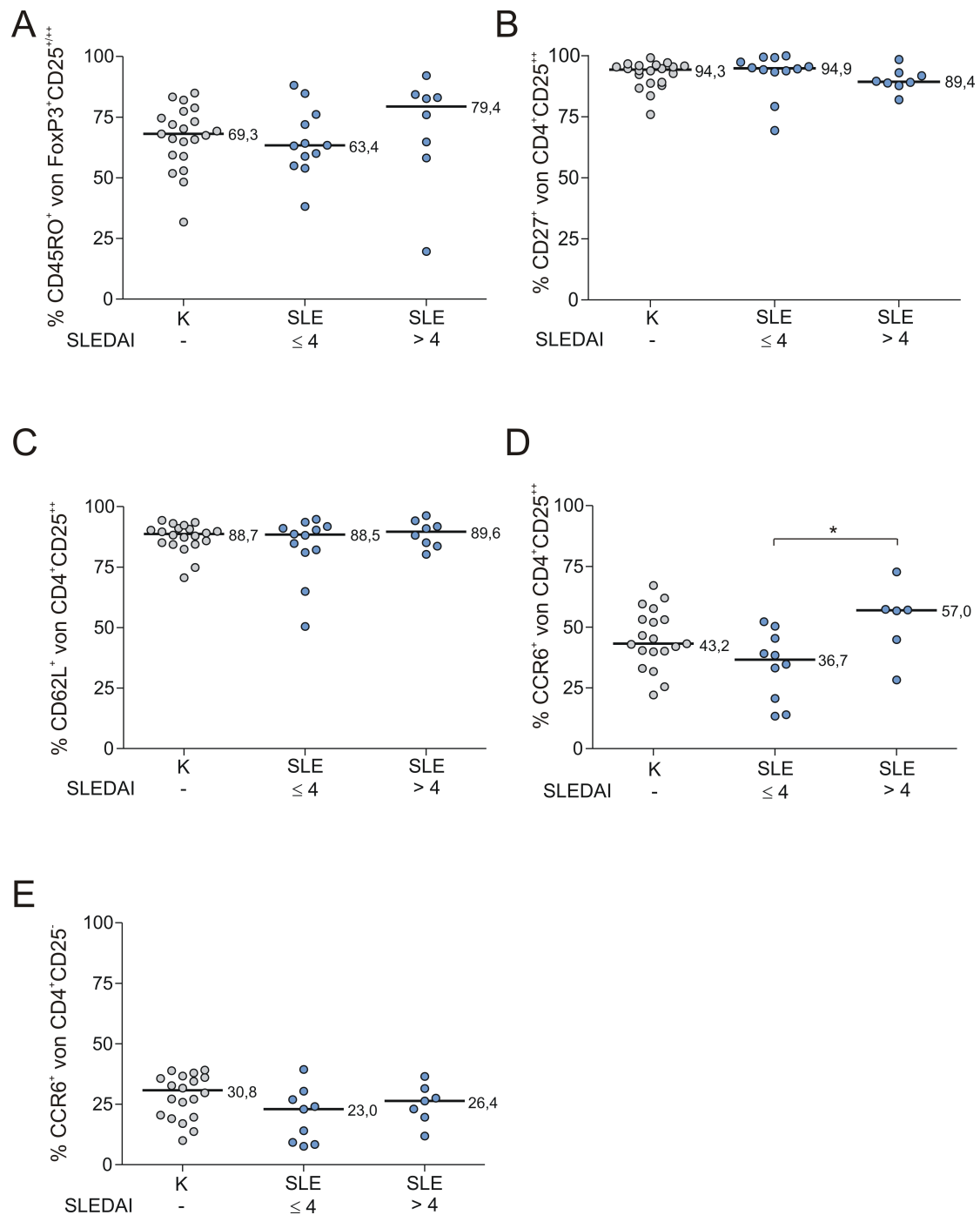


Abbildung 15: Charakterisierung von Treg im Blut von Patienten mit SLE. (A) Durchflusszytometrische Analyse für die Marker CD45RO, (B) CD27, (C) CD62L und (D-E) CCR6 (SLEDAI ≤4: SLE inaktiv, SLEDAI >4: SLE aktiv, * p=0,0312).

T-Zellen rekrutiert wird. Somit liefern die Untersuchungen von Treg keine Hinweise auf pathologische Veränderungen bei dieser Autoimmunerkrankung. Über eine veränderte Funktionalität der Treg als Ursache des SLE finden sich in der Literatur sehr widersprüchliche Daten und weitere Untersuchungen sind nötig, um die Beteiligung der Treg bei dieser Erkrankung zu klären.

4 Diskussion

Die Aufgabe des Immunsystems besteht in der Abwehr von Pathogenen bei gleichzeitiger Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber körpereigenen Strukturen. Falls das empfindliche Gleichgewicht zwischen Immunität und Toleranz gestört wird, kann es zu Autoimmunreaktionen kommen. SLE ist eine heterogene Autoimmunerkrankung, deren Pathogenese bis heute weitgehend ungeklärt ist. Verschiedene Studien berichten über ein vermehrtes Auftreten von apoptotischen Zellen im Blut von Patienten mit SLE (Courtney et al. 1999; Ren et al. 2003; Landry 1977; Bijl et al. 2006; Shoshan et al. 2001; Salmon et al. 1984). Die apoptotischen Zellen werden unter anderem von DC aufgenommen, die nachfolgend darin enthaltene Antigene T-Zellen präsentieren. Den DC kommt eine besondere Stellung zu, da ihr Verhalten über Toleranz *vs.* Immunität entscheidet. Die hier vorgestellte Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob und in welcher Weise das natürliche Zusammenspiel von apoptotischen Zellen und DC in Patienten mit SLE gestört sein könnte.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bei Patienten mit SLE im Vergleich zu gesunden Kontrollen kein intrinsischer Defekt der apoptotischen Zellen nachweisbar ist. Neutrophile Granulozyten, die aus dem Blut von Patienten mit SLE isoliert wurden, verhalten sich wie neutrophile Granulozyten von gesunden Kontrollen im Bezug auf den zeitlichen Verlauf der Apoptose und die Apoptoserate. Darüber hinaus zeigen sich keine Unterschiede in der Fähigkeit, die durch TLR-Liganden induzierte TNF-Produktion in U937-Zellen zu supprimieren. DC von Patienten mit SLE produzieren in vergleichbarem Maße wie DC von gesunden Kontrollen nach Stimulation mit LPS TNF bzw. exprimieren in vergleichbarem Maße kostimulatorische Marker. Es lassen sich auch keine signifikanten Unterschiede in der Supprimierbarkeit durch apoptotische Zellen erkennen.

Annexin 1 ist ein Molekül, das früh im Verlauf der Apoptose externalisiert wird und auf der Zelloberfläche an Phosphatidylserin bindet. In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass mit Annexin 1 behandelte DC schwächer durch Gefahrensignale wie z.B. LPS aktiviert werden (Weyd 2006; Dörner 2007). Das lässt sich sowohl durch die verminderte Sekretion anti-inflammatorischer Zytokine, als auch durch die verminderte Oberflächenexpression von kostimulatorischen Molekülen nachweisen. Die Zugabe von Annexin 1 in das Kulturmedium übt den gleichen Effekt auf DC aus, wie die Kokultur mit apoptotischen Zellen. Es erscheint daher wahrscheinlich, dass Annexin 1 für

diesen Effekt verantwortlich ist. Somit ist Annexin 1 ein Molekül, das bei der Interaktion zwischen apoptotischen Zellen und DC eine Rolle spielt. Eine Störung der durch Annexin 1 ausgelösten Prozesse kann daher möglicherweise zur Entstehung von Autoimmunkrankheiten beitragen.

Die Oberflächenexpression von Annexin 1 auf neutrophilen Granulozyten während der Apoptose ist bei Patienten mit SLE im Vergleich zu gesunden Kontrollen sowohl im Ausmaß der Exposition als auch im zeitlichen Verlauf unverändert. Bei 29 % der Patienten mit SLE lassen sich Antikörper gegen Annexin 1 nachweisen. Diese Antikörper haben jedoch einen geringen Einfluß auf die Supprimierbarkeit von DC durch apoptotische Zellen. Ebenso ist das Phagozytoseverhalten primärer DC in Anwesenheit dieser Antikörper nicht signifikant verändert. Da die Seren von Patienten mit SLE häufig Antikörper unterschiedlicher Spezifität enthalten, die in der Lage sind, an apoptotische Zellen zu binden, ist der Einfluss von Antikörpern gegen Annexin 1 nicht eindeutig nachweisbar, die Effekte sind aber als gering einzuschätzen.

DC können nicht nur durch die Interaktion mit apoptotischen Zellen supprimiert werden, sondern auch durch die Interaktion mit Treg. Bei einer Störung dieses Mechanismus der peripheren Toleranz treten im Maussystem Autoimmunreaktionen auf. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Anzahl der Treg im peripheren Blut von Patienten mit SLE im Vergleich zu gesunden Kontrollen nicht erniedrigt ist. Die Analyse weiterer Marker zeigt eine signifikante Erhöhung von CCR6 sowohl bei aktiven als auch bei inaktiven Patienten mit SLE. CCR6 ist für die Rekrutierung der Treg an Orte der Entzündung notwendig. Die vermehrte Expression von CCR6 auf Treg von Patienten mit SLE kann dadurch erklärt werden, dass diese im Vergleich zu gesunden Kontrollen vermehrt unter Entzündungen leiden.

4.1 Apoptotische neutrophile Granulozyten von Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen unterscheiden sich weder in ihrem Apoptotseverhalten noch in der Fähigkeit, die Aktivierung von U937-Zellen zu supprimieren

Verschiedene Gruppen beschreiben ein vermehrtes Auftreten apoptotischer Leukozyten im Blut von Patienten mit SLE (Perniok et al. 1998; Courtney et al. 1999; Ren et al. 2003; Landry 1977; Bijl et al. 2006; Shoshan et al. 2001; Salmon et al. 1984). Um

diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurden neutrophile Granulozyten aus dem Blut von Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen isoliert. Neutrophile Granulozyten sind ein gutes Modell zur Untersuchung der spontanen Apoptose, da sie in Kultur durch das Fehlen von zytokininduzierten Überlebenssignalen spontan sterben. In den durchgeführten Versuchen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen neutrophilen Granulozyten aus dem Blut von Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen in Bezug auf den zeitlichen Verlauf der Apoptose und die Anzahl apoptotischer Zellen festgestellt werden. Die Zellen zeigen ein vergleichbares Verhalten hinsichtlich Phosphatidylserinexposition auf der Oberfläche, DNA-Fragmentierung und Membranpermeabilisierung. In diesem Punkt widersprechen die Daten den Arbeiten von Courtney et al. (1999), Perniok et al. (1998) und Ren et al. (2003). Dieser Umstand ist möglicherweise auf Unterschiede in der Isolierung der Zellen und den verwendeten Kulturmedien und Serumzusätzen zurückzuführen. Courtney et al. (1999) und Perniok et al. (1998) analysierten die Zellen mit Annexin 5- und PI-Färbung direkt nach der Isolierung. Die gezeigte Abgrenzung der unterschiedlichen Populationen von apoptotischen und lebenden Zellen in den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Untersuchung unterscheidet sich zudem von der in dieser Arbeit angewandten und kann daher zu abweichenden Ergebnissen führen. Ren et al. (2003) führten May-Giemsa-Färbungen für den Nachweis der Apoptose in neutrophilen Granulozyten durch und werteten nachfolgend mikroskopische Bilder aus. Die Bewertungskriterien für die Einteilung in apoptotische und lebende Zellen werden jedoch in dieser Publikation nicht genauer dargelegt. Diese Methode ist daher ohne ausreichende Standardisierung fraglich und kann als wenig vergleichbar angesehen werden. Aus diesem Umstand ergeben sich Probleme beim Vergleich dieser Studie mit der hier gezeigten Analyse.

In den Experimenten dieser Arbeit wurden keine Unterschiede im Apoptoseverhalten zwischen neutrophilen Granulozyten von Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen beobachtet. Ein zellintrinsischer Unterschied in der Apoptose wird daher durch diese Daten nicht unterstützt. Es ist jedoch anzumerken, dass eine erhöhte Apoptoserate von neutrophilen Granulozyten, die aus dem peripheren Blut von Patienten mit SLE isoliert wurden, nicht auszuschließen ist, da die Situation *in vivo* sehr viel komplexer sein kann, als es durch die *in vitro* Bedingungen wiedergegeben werden kann. Serumfaktoren wie Antikörper, Zytokine oder Liganden für Apoptoserezeptoren könnten *in vivo* eine entscheidende Rolle spielen und die Anzahl apoptotischer Zellen erhöhen. Andere Gruppen haben in diesem Zusammenhang die Steigerung der Apoptoserate in Anwe-

senheit von Autoimmunserum beschrieben (Bengtsson et al. 2004, 2008; Ren et al. 2003; Klint et al. 2000). Diese Möglichkeit scheint jedoch auf Monozyten beschränkt zu sein und ist auf Grund der vorliegenden Daten zumindest für neutrophile Granulozyten unwahrscheinlich, da sich keine Unterschiede in der Anzahl der apoptotischen neutrophilen Granulozyten direkt nach der Isolierung detektieren ließen. Man müsste somit einen selektiven Mechanismus für einzelne Zellarten postulieren.

Eine erhöhte Apoptoserate, die zu sekundärer Nekrose und damit zu Entzündungsreaktionen führt, ist nur eine Hypothese zur Pathogenese des SLE und wurde bisher nicht durch experimentelle funktionelle Analysen bestätigt. Dass sich diese in den dargestellten Experimenten nicht bestätigt hat, schließt den Einfluss eines veränderten Apoptoseverhaltens nicht aus. Apoptotische Zellen könnten hinsichtlich ihrer Interaktion mit phagozytierenden Zellen wie DC ein verändertes Verhalten aufweisen. Die Phagozytose apoptotischer Zellen und der damit einhergehende suppressive Effekt auf DC können wichtige Faktoren in der peripheren Toleranzinduktion sein. Eine verminderte Aufnahme oder eine veränderte Interaktion von apoptotischer Zelle und Phagozyt müssten sich in einer verminderten Suppression der DC nach Stimulation mit Gefahrensignalen widerspiegeln. Die Suppressivität apoptotischer neutrophiler Granulozyten von Patienten mit SLE war im Vergleich zu neutrophilen Granulozyten aus gesunden Kontrollen nicht signifikant unterschiedlich. Auch in diesem Zusammenhang kann nicht ausgeschlossen werden, dass lösliche Serumkomponenten *in vivo* einen starken Einfluss ausüben und das Milieu die Phagozytoserate der apoptotischen Zellen oder den suppressiven Effekt vermindert. *In vitro* wurde in Migrationsexperimenten gezeigt, dass Seren von Patienten mit SLE die Fähigkeiten von apoptotischen Zellen hemmen können, Makrophagen anzulocken, um die eigene Beseitigung zu beschleunigen (GaipI et al. 2007).

Im Bezug auf Makrophagen wurden bei Patienten mit SLE Defizite in der Phagozytose von apoptotischen Zellen nachgewiesen (Herrmann et al. 1998; Baumann et al. 2002; GaipI et al. 2007). Die experimentellen Daten dieser Studien wurden jedoch größtenteils durch mikroskopische Untersuchungen an immunhistologischen Schnitten erhoben und lassen daher Zweifel an der korrekten Quantifizierung aufkommen. Zudem ist der Einfluss von Makrophagen auf die periphere Toleranzinduktion im Vergleich zu DC als geringer zu bewerten.

4.2 DC von Patienten mit SLE lassen sich in gleichem Maße wie DC von gesunden Kontrollen durch Gefahrensignale stimulieren und werden durch die Aufnahme apoptotischer Zellen supprimiert

Von verschiedenen Gruppen wurde postuliert, dass die Phagozytose apoptotischer Zellen in Patienten mit SLE gestört ist (Baumann et al. 2002; Gaipf et al. 2007). Die Folge wäre eine verminderte Suppression der Phagozyten und eine erhöhte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine nach Stimulation und ein Übergang der suppressiven frühapoptotischen Zellen in möglicherweise nicht-suppressive sekundär nekrotische Zellen. Diese Hypothese wird durch die vorliegenden Experimente nicht unterstützt. DC von Patienten mit SLE weisen eine vergleichbare Supprimierbarkeit durch apoptotische Zellen wie DC von gesunden Kontrollen auf. Weiterhin zeigen sich keine Unterschiede in der Stimulierbarkeit der DC von Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen durch Stimulation mit Gefahrensignalen, wie z.B. LPS. Das spricht dafür, dass kein zellintrinsischer Defekt hinsichtlich Aktivierbarkeit durch Gefahrensignale und Supprimierbarkeit durch apoptotischen Zellen vorliegt. Da zur Differenzierung der DC *in vitro* standardisiertes FCS verwendet wurde, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sich DC von Patienten mit SLE, die während ihrer Differenzierung möglicherweise einem pro-inflammatorischen Milieu ausgesetzt waren, *in vivo* anders verhalten.

In den meisten Studien wurden Makrophagen und nicht DC in Bezug auf ihre Phagozytosekapazität untersucht (Baumann et al. 2002; Gaipf et al. 2007). Diese Zellen spielen jedoch eine geringere Rolle bei der Aktivierung autoreaktiver T-Zellen, da ihre Hauptaufgabe in der Phagozytose und nicht in der Auslösung primärer Immunantworten besteht. Das Phagozytoseverhalten der DC von Patienten mit SLE ist hingegen kaum untersucht worden. Phagozytose könnte insofern beim SLE eine wichtige Rolle spielen, als dass DC möglicherweise sekundär nekrotisches Material aufnehmen und in den Lymphknoten präsentieren. Die vorliegenden Ergebnisse widersprechen aber einem solchen Mechanismus und den Ergebnissen der anderen Arbeitsgruppen nicht. Im Gegenteil kann festgestellt werden, dass weder apoptotische neutrophile Granulozyten noch primäre DC einen zellintrinsischen Defekt aufweisen und damit einen direkten Weg für eine Verminderung der peripheren Toleranz *in vivo* aufzeigen. Da DC als entscheidender Schalter für die periphere Toleranzinduktion wirken, ist nicht auszuschließen, dass in der Pathogenese des SLE weitere Faktoren auf DC einwirken und so

Autoimmunreaktionen ermöglichen.

4.3 Das Serum von Patienten mit SLE enthält Autoantikörper gegen Annexin 1

Annexin 1 wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Krammer als ein Molekül entdeckt, das in einem frühen Stadium der Apoptose externalisiert wird und auf der Zelloberfläche kalziumabhängig an Phosphatidylserin bindet (Weyd 2006; Riess 2006). Wenn es als rekombinantes Molekül zu primären DC zugefügt wird, hemmt es deren Aktivierung durch Gefahrensignale. Die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine und die Expression kostimulatorischer Moleküle auf der Oberfläche der DC sind vermindert. Dieser Effekt kann (im Maussystem) durch F(ab)₂-Fragmente eines polyklonalen Kaninchenserums gegen Annexin 1 aufgehoben werden (Dörner 2007). Annexin 1 könnte damit eine Rolle bei der Induktion peripherer Toleranz spielen und eine Störung dieses Mechanismus könnte an der Pathogenese des SLE beteiligt sein.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen keinen Unterschied in der Quantität und dem zeitlichem Verlauf der Exposition von Annexin 1 auf der Oberfläche apoptotischer neutrophiler Granulozyten von Patienten mit SLE und gesunden Kontrollen. Dies passt sehr gut zu den Beobachtungen der anderen apoptotischen Ereignisse, die in dieser Arbeit untersucht worden sind, wie z.B. Phosphatidylserinexposition, DNA-Fragmentierung und Membranpermeabilisierung und bestärkt die Aussage, dass neutrophile Granulozyten von Patienten mit SLE im Vergleich zu gesunden Kontrollen keine intrinsischen Veränderungen hinsichtlich Apoptose aufweisen.

Das Annexin 1-System könnte aber auch indirekt beeinflusst sein. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass mit 29 % ein hoher Prozentsatz der Patienten mit SLE Antikörper gegen Annexin 1 im Serum aufweisen. Hingegen wurden bei weniger als halb so vielen Patienten mit CLE (11 %), bei denen sich die Erkrankung primär auf die Haut beschränkt, Antikörper gegen Annexin 1 nachgewiesen. Andere Antikörper wie z.B. ANA werden im Vergleich dazu bei über 90 % der Patienten mit SLE nachgewiesen; anti-dsDNA Antikörper, die beim SLE als pathognomonisch angesehen werden, treten bei 40-60 % der Patienten mit SLE auf, ebenso wie anti-Ro/SSA Antikörper, die charakteristisch für den subakut kutanen Lupus erythematoses sind. Anti-nRNP Antikörper finden sich bei 20-30 % der Patienten und sind vergleichbar in der Häufigkeit zu Antikörpern

gegen Annexin 1 (Übersicht der labordiagnostisch relevanten Antikörper im SLE in Thumb 2001). Daneben werden anti-Sm Antikörper und anti-La/SSB Antikörper nur in 10-15 %, bzw. 15-20 % der Patienten mit SLE nachgewiesen. Die Häufigkeit des Auftretens von Antikörpern gegen Annexin 1 ist somit teilweise vergleichbar mit den bereits bekannten Antikörpern bei Patienten mit SLE.

In den vorliegenden Experimenten zeigte sich, dass Seren von Patienten mit SLE Antikörper der IgG-Klasse besitzen, die spezifisch an apoptotische Zellen binden.

Hinsichtlich der funktionellen Wirkung von Antikörpern gegen Annexin 1 auf die Suppressibilität von DC und deren Phagozytoserate wurde jedoch in *in vitro*-Experimenten kein signifikanter Unterschied im Vergleich von Seren mit und ohne Antikörper gegen Annexin 1 festgestellt. Es zeigten sich kleinere Abweichungen in Hinsicht sowohl einer verringerten als auch einer verstärkten Suppression. Eine Erklärung hierfür kann zum einen sein, dass die Annexine möglicherweise ein weitgehend redundantes System darstellen und der Ausfall einzelner Annexine kompensiert werden kann. Zum anderen handelt es sich trotz der Aufreinigung der Seren über Protein A-Sepharose um Gemische von Antikörpern, die viele unterschiedliche Epitope erkennen können. Um den Effekt der Antikörper gegen Annexin 1 getrennt zu untersuchen, müssten affinitätsgereinigte Antikörper verwendet werden. Dies ist auf Grund der geringen Menge spezifischer Antikörper im Serum technisch schwierig. Jedoch kann daher vermutet werden, dass Antikörper gegen Annexin 1 nicht der ursächliche Mechanismus sind, der für den Einfluss des Immunerums verantwortlich ist.

Zusammenfassend haben Antikörper gegen Annexin 1 in den durchgeführten Experimenten weder einen blockierenden Effekt auf die Suppressibilität apoptotischer Zellen gegenüber DC noch auf die Phagozytose apoptotischer Zellen durch DC. Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass das Annexin 1-System für die Pathogenese des SLE eine entscheidende Rolle spielt.

4.4 Treg sind in Anzahl und Phänotyp nicht verändert

Treg wurden als weiterer zellulärer Bestandteil der peripheren Toleranz bzw. als essentielle Komponenten zur Verhinderung von Autoimmunerkrankungen beschrieben (Nishizuka and Sakakura 1969). Es konnte insbesondere im Mausmodell gezeigt werden, dass nach Depletion dieser Zellen leichter Autoimmunerkrankungen induziert werden

können, wie z.B. Diabetes mellitus, experimentelle Autoimmunenkephalitis, oder es entsteht spontan eine scurfy-ähnliche Erkrankung (Tritt et al. 2008; Reddy et al. 2005; Lahl et al. 2007). Im Menschen gibt es Hinweise, dass im Zusammenhang mit Krebserkrankungen die lokale Verminderung der Anzahl der Treg hilfreich sein kann, um die Toleranz gegen den Tumor, der die Merkmale körpereigenen Gewebes trägt, aufzuheben (Morse et al. 2008; Rasku et al. 2008; Mahnke et al. 2007). In diesem Zusammenhang wird das Risiko der Induktion von Autoimmunerkrankungen immer wieder diskutiert. In der Pathogenese des SLE könnte das verminderte Auftreten von Treg eine Rolle spielen, indem die T-Zellantwort bei einer Entzündung nicht ausreichend kontrolliert ist und somit auch Tcon aktiviert werden, die Autoantigene erkennen. Ob es sich um eine reduzierte Entstehung im Thymus oder eine verminderte Induktion in der Peripherie handelt, ist bei einer Quantifizierung zunächst nicht festzustellen. Experimente mit MRL/lpr-Mäusen, bei denen ein Defekt im *CD95*-Gen zur verminderten Expression von CD95 führt und die einen Lupus-ähnlichen Phänotyp mit erhöhten Mengen von Autoantikörpern und zirkulierenden Immunkomplexen sowie nachfolgender Lupus-Nephritis aufweisen, sprechen für eine defiziente Induktion in der Peripherie, bei der ein verändertes Verhalten der Tcon und DC eine wichtige Rolle spielt (Yang et al. 2008). Die Mäuse zeigten eine verringerte Anzahl von Treg in der Peripherie, die durch eine defiziente IL-2-Produktion von T_H1 und damit verbundenen Defekten von DC hervorgerufen wurde. Durch Zugabe von IL-2 konnte die suppressive Kapazität der Treg wieder hergestellt und die SLE-ähnlich Symptomatik verringert werden.

In den durchgeführten Experimenten konnte keine erniedrigte Anzahl sowohl der FoxP3⁺CD25^{+/++} als auch der FoxP3⁺CD25⁺⁺ Treg festgestellt werden. Weiterhin unterscheiden sich die Zellen von Patienten mit SLE hinsichtlich der Expression von CD45RO, CD45RA, CD27 und CD62L phänotypisch nicht von gesunden Kontrollen. Es gibt sowohl Publikationen, die eine Erniedrigung der Treg bei Patienten mit SLE beschreiben (Valencia et al. 2007; Miyara et al. 2005; Kuhn et al. 2009), als auch solche, die eine Erhöhung der Anzahl der Treg im peripheren Blut postulieren (Suarez et al. 2006; Lin et al. 2007; Kuhn et al. 2009). Die unterschiedliche Verwendung von Markern wie CD25 und FoxP3, sowie unterschiedliche Auswertestrategien der Durchflusszytometrie könnten einen Einfluss auf die Ergebnisse haben. Zusätzlich spielen der Aktivitätsstatus der Erkrankung und die Medikation der untersuchten Patienten eine Rolle. In der Literatur wurde z.B. beschrieben, dass die Einnahme von Glukokortikosteroiden mit einem Anstieg der Anzahl von Treg im peripheren Blut korreliert (Azab et al. 2008).

In der Literatur wird auch kontrovers diskutiert, ob Treg von Patienten mit SLE einen funktionalen Defekt aufweisen (Bonelli et al. 2008), oder ob eventuell ein Defekt der Tcon besteht, sodass diese sich schlechter supprimieren lassen (Venigalla et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch die Funktionalität der Zellen auf Grund der geringen Menge an Ausgangsmaterial nicht untersucht werden. Zukünftige Studien sind daher notwendig, um diesen Sachverhalt zu klären.

4.5 Die Auswahl der Patienten spielt möglicherweise eine Rolle für die erzielten Ergebnisse

Da der SLE eine heterogene Autoimmunerkrankung ist, zeigen die Patienten unterschiedliche bzw. unterschiedlich stark ausgeprägte Symptome sowie eine Variabilität im Ansprechen auf Medikamente. In die vorliegende Arbeit wurden nur solche Patienten eingeschlossen, die neben einer gesicherten Diagnose auch Antikörper gegen dsDNA aufwiesen, die als besonders spezifisch für einen SLE angesehen werden. Insgesamt wurden in dieser Arbeit Patienten mit niedrigem Aktivitätsgrad untersucht, um mögliche zellintrinsische Effekte zu identifizieren. Zum einen wäre dies durch die sekundären Effekte bei sehr aktivem Krankheitsbild schwerer möglich gewesen, zum anderen werden aktive Patienten mit unterschiedlichen systemischen Medikamenten therapiert, und damit könnten sich die zellintrinsischen Effekte ebenfalls verändern.

Das Auftreten bestimmter Antikörper spielt nicht nur für die Aktivität des SLE eine Rolle, sondern kann auch zu weiteren phänotypischen Merkmalen führen. Häufig bilden sich Immunkomplexe aus Antigenen mit den gegen sie gebildeten Antikörpern, die sich durch ihre Größe in den feinen Gängen der Niere festsetzen und dort Immunzellen aus dem Blut aktivieren und dadurch zu einer sogenannten „Lupus-Nephritis“ führen können. Daneben wurde beschrieben, dass Immunkomplexe zu einer Reifung und Stimulation der DC führen und dadurch eine sterile Immunreaktion auslösen könnten (Laborde et al. 2007). Antikörper und das Auftreten von Immunkomplexen spielen daher eine wichtige Rolle für den Krankheitsverlauf des SLE. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie einen Einfluss auf die Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz haben.

Weiterhin kann die Medikation der Patienten mit SLE Einfluss auf die Analyse der untersuchten Zellen haben. Die Wirkung von Glukokortikosteroiden auf die Anzahl von

Treg wurde bereits erläutert. Außerdem ist es nicht klar, wie lang z.B. die immunsuppressive Wirkung von Glukokortikosteroiden nach der Isolierung *in vitro* bei den einzelnen Zellarten anhält. Ähnliches gilt für Immunsuppressiva und Antimalariamittel. Unter den Patienten mit SLE, die in die Arbeit eingeschlossen worden sind, waren nur zwei Patienten ohne systemische Behandlung. Die mit diesen Zellen gewonnenen Ergebnisse unterscheiden sich jedoch nicht von denen der Patienten, die eine systemische Behandlung erhielten. Um die Auswirkungen einzelner therapeutischer Strategien zu vergleichen, wären wesentlich größere Patientenzahlen dieser seltenen Autoimmunerkrankung nötig gewesen.

4.6 Zytokine und andere lösliche Faktoren haben einen Einfluss auf die Toleranzinduktion

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten funktionellen Experimente haben sich als geeignet erwiesen, um die Interaktion zwischen apoptotischen Zellen und DC zu untersuchen. Derselbe Versuchsaufbau kann verwendet werden, um auch den Einfluss weiterer Faktoren zu analysieren.

Das Zytokinmilieu wurde von vielen Autoren als wichtiger Faktor für die Pathogenese des SLE dargestellt. So konnten die Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-17, IL-18, MCP-1 (engl.: monocyte chemoattractive protein-1) und IFN α im Vergleich zu gesunden Kontrollen vermehrt im Serum von Patienten mit SLE nachgewiesen werden (al Janadi et al. 1993; Wong et al. 2000; Amerio et al. 2002; Alcocer-Varela et al. 1992; Nagahama et al. 2001; Asanuma et al. 2006; Suh et al. 2006; Lit et al. 2006; Beebe et al. 2002; Rovin et al. 2002). Zur Expression von IFN γ und TNF beim SLE finden sich widersprüchliche Aussagen in der Literatur (Miyake et al. 2002; Suh et al. 2006; Dean et al. 2000). Für IL-1 β wurde beschrieben, dass es nicht nur im Serum von Patienten mit SLE erhöht ist, sondern auch PBMC (mononukleäre Zellen des peripheren Bluts, engl.: peripheral blood mononuclear cells) eine erhöhte Expression auf RNA-Ebene aufweisen, wenn diese mit Serum von Patienten mit SLE kultiviert wurden (Means et al. 2005). Eine Blockade dieser mRNA-Expression führt zu einer Erniedrigung der spontanen IgG-Produktion; dies deutet darauf hin, dass IL-1 β diese spontane Produktion verstärkt (Jandl et al. 1987). Weiterhin ist beschrieben worden, dass IL-6 von B-Zellen von Patienten mit SLE spontan produziert wird, und die Sekretion

kann in PBMC durch die Zugabe von Serum von Patienten mit SLE induziert werden (Linker-Israeli et al. 1991). Die IL-10-Sekretion korreliert mit der Konzentration von anti-dsDNA Antikörpern im Serum, und exogenes IL-10 kann die Produktion von Antikörpern gegen einzel- oder doppelsträngige DNA erhöhen (Ronnelid et al. 2003; Tyrrell-Price et al. 2001). Die Unterschiede in der IL-10-Sekretion sind vermutlich sowohl durch Umweltfaktoren als auch durch genetische Unterschiede bedingt (Grondal et al. 2002; Nath et al. 2005). IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, IL-18 und MCP-1 sind pro-inflammatorische Zytokine, während IL-10 zu den anti-inflammatorischen Zytokinen gezählt wird.

Seit einiger Zeit konzentrieren sich die Untersuchungen beim SLE auf das Zytokin IFN α , dem eine besondere Rolle in der Pathogenese dieser Autoimmunerkrankung zugeschrieben wird. IFN α führt zur Reifung und Voraktivierung von DC, wodurch die Phagozytoserate sinkt und die Mobilität steigt. Im Serum von Patienten mit SLE wurde IFN α in erhöhten Mengen nachgewiesen (Hooks et al. 1979). Bei Patienten, die IFN α in hohen Dosen als Medikament gegen Krebserkrankungen oder chronische Virusinfekte einnahmen, ist es zum Auftreten von Lupus-ähnlichen Symptomen und erhöhten ANA Titern, sowie einer Anämie und Lymphopenie gekommen (Mehta et al. 1992; Ronnblom et al. 1991b,a; Schilling et al. 1991; Wandl et al. 1992). PBMC, die mit Serum von Patienten mit SLE kultiviert wurden, produzierten vermehrt IFN α und weisen eine verstärkte DC-Reifung auf (Blanco et al. 2001; Dall’era et al. 2005). Genexpressionsstudien zeigten, dass IFN α zur Expression eines bestimmten Spektrums von IFN α -abhängigen Genen führt (Baechler et al. 2003, 2004; Bennett et al. 2003; Crow and Wohlgemuth 2003; Han et al. 2003; Kirou et al. 2004, 2005) und dass diese „Interferon-Signatur“ in vielen Patienten mit SLE nachweisbar ist. IFN α ist also ein wichtiger Kandidat, der für die Verminderung der peripheren Toleranz verantwortlich sein könnte.

Es ist denkbar, dass die verschiedenen Faktoren im Serum von Patienten mit SLE interagieren. Vallin et al. (1999a,b) zeigten, dass eine Kombination aus anti-dsDNA Antikörpern und DNA eine IFN α -Produktion in PBMC hervorruft und Means et al. (2005) wiesen nach, dass die IFN α -Produktion von PBMC vom Vorhandensein von DNA im Serum abhängt. In diesem Zusammenhang spielen TLR 9 und Fc γ RIIa (engl.: Fragment crystallizable- γ -Receptor IIa) eine wichtige Rolle. TLR 9 wurde als Rezeptor beschrieben, der bakterielle DNA erkennt. Fc γ RIIa bindet die konstante Region von IgGs; beide Rezeptoren kolokalisieren mit den Immunkomplexen auf der Oberfläche der

Zelle, bevor die Sekretion von $\text{IFN}\alpha$ induziert wird (Means et al. 2005). Bisher konnte jedoch keine direkte Korrelation zwischen Polymorphismen in diesen Molekülen und dem Ausbruch der Krankheit festgestellt werden (De Jager et al. 2006; Hur et al. 2005; Ng et al. 2005).

Eine besondere Bedeutung im Bezug auf die Produktion von $\text{IFN}\alpha$ kommt den plasmazytoiden DC (pDC) zu, die dadurch charakterisiert sind, dass sie nach Stimulation mit mikrobieller DNA $\text{IFN}\alpha$ produzieren (Ronnlblom and Alm 2001). Die Zellen reagieren normalerweise nicht auf eukaryotische DNA, es wurden aber beschrieben, dass dieser Mechanismus bei Autoimmunerkrankungen gestört ist und dass bei Patienten mit SLE erhöhte Mengen von pDC nachgewiesen werden können (Jin et al. 2008).

Während die genannten Zytokine und Antikörper die periphere Toleranz stören könnten, wurde auch beschrieben, dass die Zellen von einigen Patienten mit SLE eine niedrigere Phagozytoserate aufweisen und dass dieser Umstand mit der erniedrigten Anzahl von zirkulierenden Komplementfaktoren korreliert (Bijl et al. 2006). Die Komponenten der Komplementkaskade tragen durch ihre Fähigkeit zur Opsonisierung zu einer beschleunigten Phagozytose bei und helfen damit bei der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz (Gullstrand et al. 2009).

4.7 Modell der Krankheitsentwicklung im SLE

Die Pathogenese von SLE hat laut zahlreicher Studien vermutlich heterogene Ursachen. Welche zellulären Komponenten für die Initiation verantwortlich sind, ist weitgehend unklar. Abbildung 16 gibt einen Überblick über diese Zusammenhänge. Jede der dargestellten Komponenten wurde in einem Teil der Patienten mit SLE als verändert beschrieben, und alle treten in einer Art Kreislauf miteinander in Wechselwirkung. So lässt sich gut erklären, dass sich das System nach dem Auslösen der Krankheit selbst erhält. Lösliche Serum-Komponenten wie z.B. Zytokine können sowohl zelluläre Bestandteile verändern als auch zur Aufrechterhaltung der Erkrankung beitragen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit widersprechen der Hypothese, dass zellintrinsiche Defekte für eine höhere Apoptoserate oder eine gestörte Interaktion von apoptotischen Zellen sorgen. Die suppressive Wirkung von apoptotischen Zellen auf DC scheint in Patienten mit SLE auf der zellulären Ebene unverändert zu sein. Dazu muss jedoch angemerkt werden, dass diese Aussage nur für *in vitro* zu DC differenzierten Mono-

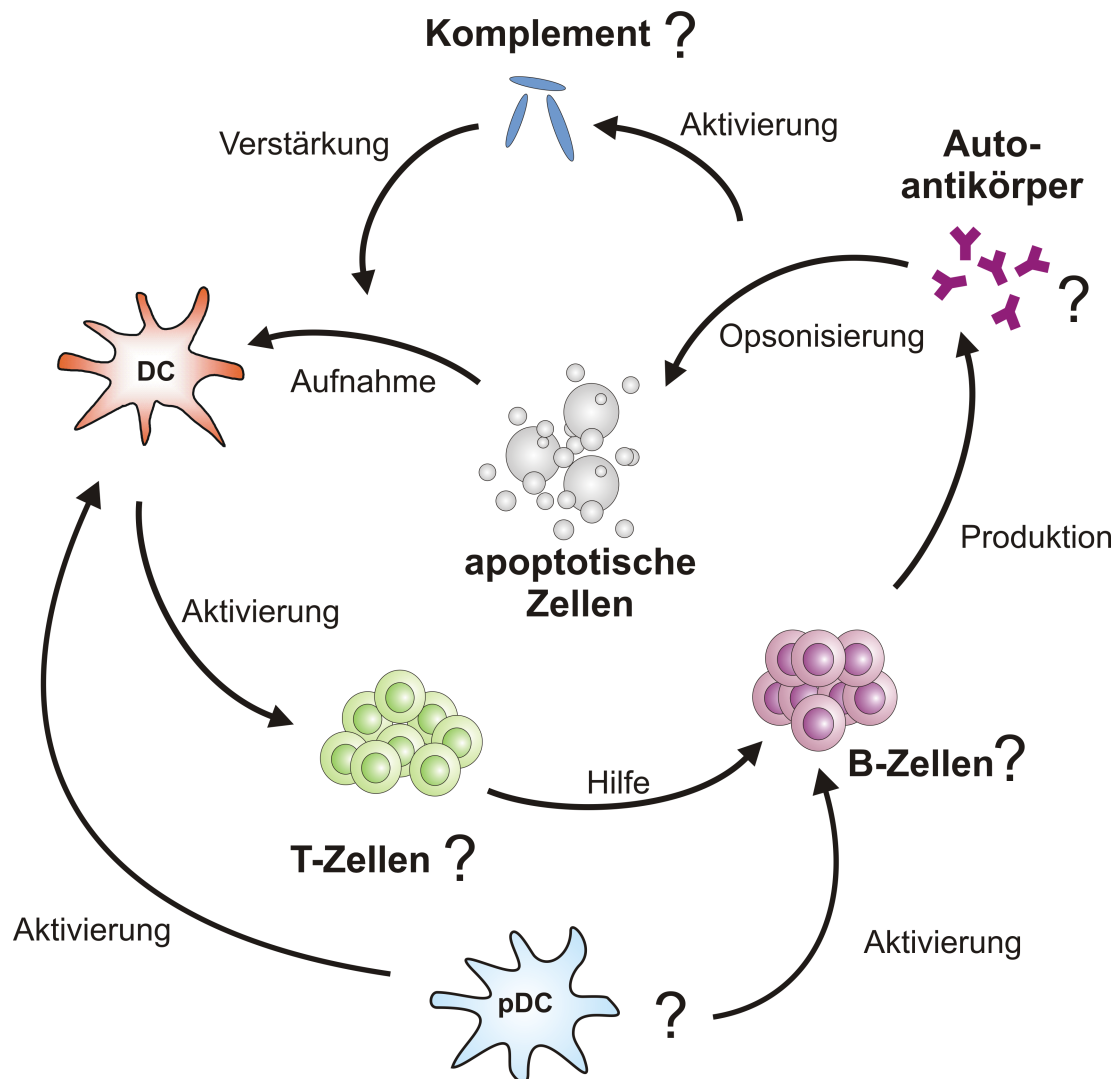


Abbildung 16: Hypothetisches Modell der krankheitsverlaufsfördernden Ereignisse im SLE. Es ist ein Kreislauf dargestellt, bei dem der Anfangspunkt variabel ist und sich nach Initiation selbst verstärkt. Apoptotische Zellen werden von myeloiden dendritischen Zellen (DC) aufgenommen und üben einen suppressiven Effekt aus. Die Phagozytose kann durch Komplementfaktoren oder Antikörper dahingehend verändert werden, dass DC autoreaktive T-Zellen aktivieren. Diese leisten autoreaktiven B-Zellen Hilfe und tragen zur deren Aktivierung bei. Autoreaktive B-Zellen produzieren Autoantikörper, die mit Komponenten des Komplementsystems wechselwirken, es aktivieren und zu einer Opsonisierung von apoptotischen Zellen führen können. Komplementfaktoren können die Aufnahme von apoptotischen Zellen durch DC verstärken. Sind sie vermindert, wie in einigen Patienten mit SLE beobachtet wurde, wird die Verweildauer apoptotischer Zellen im Körper erhöht und die Exponierung von nukleären Antigenen begünstigt. pDC können durch die Produktion von $\text{IFN}\alpha$, das auf DC und B-Zellen aktivierend wirkt, beteiligt sein. (? : alle Bestandteile dieses Systems, die in Patienten mit SLE potenziell verändert sein könnten.)

zyten getroffen werden kann. Es ist ungeklärt, in wiefern lösliche Faktoren, wie z.B. Zytokine oder spezifische Antikörper, einen modulierenden Effekt auf das Verhalten der Zellen ausüben könnten. Ebenso spielt der Einfluss der Komponenten des Komplementsystems eine große Rolle für die Opsonisierung und Phagozytose apoptotischer Zellen. Diese Einflüsse konnten in den durchgeführten Experimenten nicht untersucht werden. Deswegen ist ein verändertes funktionales Verhalten der DC nach wie vor nicht auszuschließen, wobei jedoch der Einfluss löslicher Faktoren den Ausschlag geben würde. Pro-inflammatorische Zytokine können durch plasmazytoide DC produziert werden, die eine Untergruppe der DC darstellen. Sie reagieren *in vivo* auf die Stimulation durch bakterielle DNA mit Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie z.B. $\text{IFN}\alpha$. Für diese Zellen wurde beschrieben, dass sie in Autoimmunerkrankungen wie dem SLE in erhöhter Menge vorkommen und auf zellintrinsische DNA reagieren können. Sie kommen daher als mögliche Quelle für $\text{IFN}\alpha$ in Frage. $\text{IFN}\alpha$ ist ein potentes pro-inflammatorisches Zytokin, das DC voraktivieren kann und damit die Suppression apoptotischer Zellen aufheben kann. Zudem stimuliert es die Antikörperproduktion von B-Zellen.

Neben den B-Zellen ist der Einfluss von T-Zellen von Bedeutung. Hier könnte die Interaktion von DC und T-Zellen gestört sein und nachfolgend zu B-Zellaktivierung und zur Produktion von Autoantikörpern führen. Sowohl Treg als auch Tcon könnten durch eine gestörte Funktionalität zu Pathogenese des SLE beitragen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im SLE wahrscheinlich Defekte in unterschiedlichen zellulären Systemen eine Rolle spielen, die eine Unterteilung der Patienten in Untergruppen notwendig machen.

4.8 Ausblick

SLE ist eine heterogene humane Autoimmunerkrankung mit einem komplexen klinischen Bild. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass innerhalb des Patientenkollektivs Untergruppen mit unterschiedlichen Phänotypen existieren. Auf Grund der relativ geringen Anzahl untersuchter Patienten in dieser Arbeit, lassen sich nur sehr eingeschränkt Aussagen über mögliche Untergruppen der Patienten machen. Ob solche Untergruppen in Hinsicht auf Defekte bei apoptotischen Zellen oder DC existieren, kann nur mit ausreichender Gewissheit an einem sehr viel größeren Patientenkollektiv

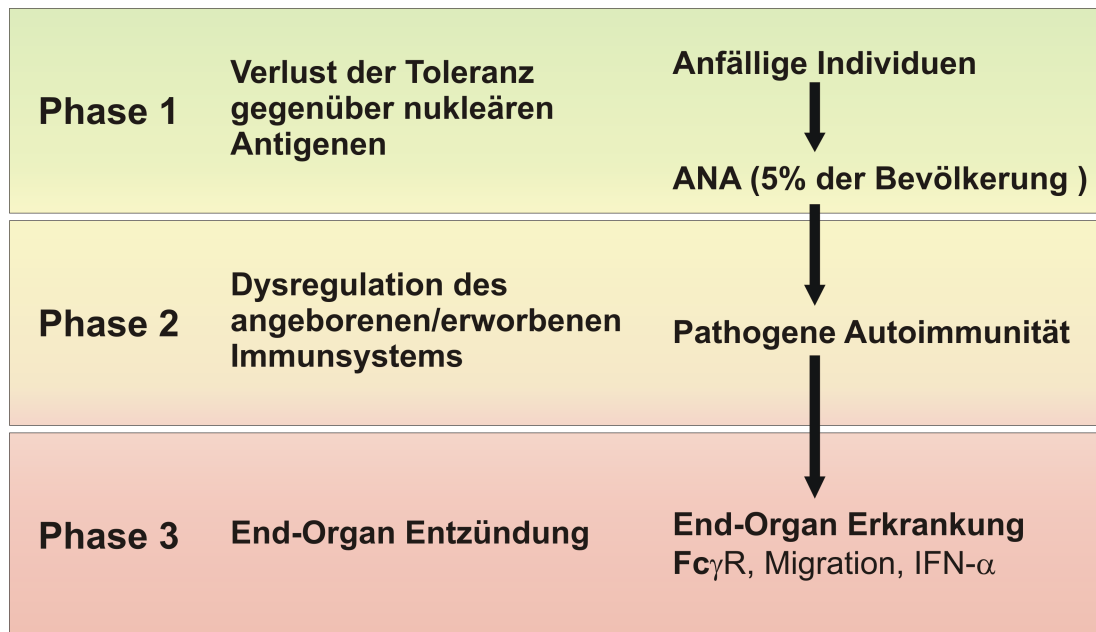


Abbildung 17: Hypothetische Phasen in der Krankheitsentwicklung des SLE. SLE lässt sich in drei Phasen einteilen. Phase 1 entsteht durch den Verlust der Toleranz gegenüber nukleären Antigenen. Bei ca. 5% der Bevölkerung lassen sich ANA nachweisen. Ein Auftreten dieser Antikörper geht dem Ausbruch der Krankheit oft lange Zeit voraus. Phase 2 stellt die Dysregulation des Immunsystems dar und ist durch pathogene Autoimmunität gekennzeichnet. Phase 3 repräsentiert die Entzündung von End-Organen, sie zeichnet sich durch genetische Prädisposition in den drei Systemen Fc_γR, Migration und IFN_α aus. (Abbildung verändert nach Fairhurst 2006)

untersucht werden. Sollten solche Untergruppen jedoch tatsächlich existieren, müsste es sich jeweils um einen kleinen Teil der Patienten handeln, da sich eine vergleichsweise große Untergruppe sonst bereits in der untersuchten Gruppe hätte nachweisen lassen müssen.

Häufig lassen sich komplexe Zusammenhänge *in vivo* nur unvollständig unter reduzierten *in vitro*-Bedingungen nachvollziehen. Die Ergebnisse der Arbeit haben gezeigt, dass lösliche Faktoren einen Einfluss auf das Verhalten der apoptotischen Zellen und der DC haben. Da Zytokine eine große Rolle in der Modulation der Immunantwort spielen, könnte eine detaillierte Analyse der Zusammensetzung und Menge der Zytokine im Serum Aufschluss über das Milieu geben, das einen Einfluss auf die periphere Toleranzinduktion ausübt. Die in der Arbeit verwendeten funktionellen Experimente sind gut geeignet, um durch Zytokine ergänzt zu werden. So könnte z.B. ein Zytokin zugesetzt werden, und der Einfluss auf das Suppressionsverhalten untersucht werden. Außerdem könnte das entsprechende Zytokin zum Differenzierungsmedium der Monozyten zugesetzt werden, um so den Einfluss auf den Aktivitätsstatus und die Supprimierbarkeit der DC zu analysieren. Dies könnte zu neuen Therapie-Optionen durch den Einsatz von blockierenden Antikörpern gegen das entsprechenden Zytokin führen.

HMGB-1 wurde als ein weiteres Molekül beschrieben, dass die Reaktion der DC in Richtung Entzündungsreaktion verschieben kann (Hanley et al. 2004; Shi et al. 2003; Binder et al. 2000; Scaffidi et al. 2002). Der Einfluss von HMGB-1 ließe sich ebenfalls in den verwendeten Kokultursystemen durch Zugabe des aufgereinigten Proteins untersuchen.

Neben den in dieser Arbeit untersuchten zellulären Systemen scheinen B-Zellen ebenfalls eine große Rolle in der Pathogenese des SLE zu spielen. In zukünftigen Experimenten könnten daher auch B-Zellen parallel untersucht werden und in Kokultorexperimenten mit T-Zellen von Patienten mit SLE analysiert werden.

Über die Verwendung von Treg in der Therapie des SLE wird schon seit längerem nachgedacht. Um eine Immuntherapie auf zellulärer Ebene einzuführen, die z.B. über *in vitro* expandierte Treg bewerkstelligt werden könnte, ist das Wissen über die mechanistischen Zusammenhänge im SLE jedoch noch zu gering. Weitere Untersuchungen zur Interaktion von DC und Treg im Umfeld einer Autoimmunerkrankung sind notwendig und könnten nicht nur für Patienten mit SLE neue Wege zur therapeutischen Intervention eröffnen. Andere Autoimmunerkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus, könnten ebenfalls von diesem Wissen profitieren.

In zukünftigen Arbeiten sollte neben der Anzahl der untersuchten Patienten auch die Auswahl der Patienten nach möglichst vergleichbarer phänotypischer Ausprägung der Erkrankung einbezogen werden, um größtmögliche Vergleichbarkeit der Patienten zu gewährleisten. Diese Untersuchungen müßten dann jedoch in Zusammenarbeit mit vielen Kliniken durchgeführt werden, da gerade dieser Aspekt organisatorisch schwierig an einem Zentrum zu bewältigen ist.

Zukünftige Studien zur Pathogenese des SLE könnten auch zur weiteren Differenzierung von Subtypen des SLE beitragen und charakteristische Defizite in unterschiedlichen Zellsystemen, die an der Induktion und Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz beteiligt sind, evaluieren.

Abbildungsverzeichnis

1	Zentrale und periphere Toleranz in Bezug auf T-Zellen	14
2	Schematische Darstellung der Induktion tolerogener DC	19
3	Krankheitsmerkmale des SLE	29
4	Apoptosekinetik primärer neutrophiler Granulozyten von Patienten mit SLE im Vergleich zu gesunden Kontrollen	58
5	DC-ähnliche Differenzierung der monozytischen Zelllinie U937	60
6	Supprimierbarkeit von U937-Zellen durch apoptotische neutrophile Gra- nulozyten	61
7	Stimulierbarkeit primärer DC	62
8	Expression von Aktivierungsmarkern auf der Oberfläche von DC nach Stimulation	63
9	Suppressiver Effekt apoptotischer Zellen auf DC	65
10	Expression von Annexin 1 auf der Oberfläche apoptotischer neutrophiler Granulozyten	66
11	Nachweis von Autoantikörpern gegen Annexin 1 im Serum	69
12	Antikörper aus den Seren von Patienten mit SLE binden an apoptotische Jurkat T-Zellen	70
13	Antikörper aus dem Serum von SLE Patienten haben einen geringen Einfluss auf die Phagozytoserate	73
14	Quantifizierung von Treg im Blut von Patienten mit SLE	74
15	Charakterisierung von Treg im Blut von Patienten mit SLE	76
16	Hypothetisches Modell der krankheitsverlaufsfördernden Ereignisse im SLE	90
17	Hypothetische Phasen in der Krankheitsentwicklung des SLE	92

Literatur

- Adams, J. M. and Cory, S. (2002). Apoptosomes: Engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol*, 14(6):715–20.
- Akbari, O., DeKruyff, R. H., and Umetsu, D. T. (2001). Pulmonary dendritic cells producing il-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol*, 2(8):725–31.
- al Janadi, M., al Balla, S., al Dalaan, A., and Raziuddin, S. (1993). Cytokine profile in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other rheumatic diseases. *J Clin Immunol*, 13(1):58–67.
- Albert, M. L., Jegathesan, M., and Darnell, R. B. (2001). Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of cd8+ t cells. *Nat Immunol*, 2(11):1010–7.
- Alcocer-Varela, J. and Alarcon-Segovia, D. (1982). Decreased production of and response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest*, 69(6):1388–92.
- Alcocer-Varela, J., Aleman-Hoey, D., and Alarcon-Segovia, D. (1992). Interleukin-1 and interleukin-6 activities are increased in the cerebrospinal fluid of patients with cns lupus erythematosus and correlate with local late t-cell activation markers. *Lupus*, 1(2):111–7.
- Amerio, P., Frezzolini, A., Abeni, D., Teofoli, P., Girardelli, C. R., De Pita, O., and Puddu, P. (2002). Increased il-18 in patients with systemic lupus erythematosus: Relations with th-1, th-2, pro-inflammatory cytokines and disease activity. il-18 is a marker of disease activity but does not correlate with pro-inflammatory cytokines. *Clin Exp Rheumatol*, 20(4):535–8.
- Anderson, M. S., Venanzi, E. S., Klein, L., Chen, Z., Berzins, S. P., Turley, S. J., von Boehmer, H., Bronson, R., Dierich, A., Benoist, C., and Mathis, D. (2002). Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*, 298(5597):1395–401.
- Apostolou, I., Sarukhan, A., Klein, L., and von Boehmer, H. (2002). Origin of regulatory t cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol*, 3(8):756–63.
- Apostolou, I. and von Boehmer, H. (2004). In vivo instruction of suppressor commitment in naive t cells. *J Exp Med*, 199(10):1401–8.
- Aringer, M. and Smolen, J. (2006). Systemic lupus erythematosus—activity and outcome. *Z Rheumatol*, 65(2):103–6, 108–9.
- Arur, S., Uche, U. E., Rezaul, K., Fong, M., Scranton, V., Cowan, A. E., Mohler, W., and Han, D. K. (2003). Annexin i is an endogenous ligand that mediates apoptotic cell engulfment. *Dev Cell*, 4(4):587–98.
- Asanuma, Y., Chung, C. P., Oeser, A., Shintani, A., Stanley, E., Raggi, P., and Stein, C. M. (2006). Increased concentration of proatherogenic inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus: Relationship to cardiovascular risk factors. *J Rheumatol*, 33(3):539–45.
- Azab, N. A., Bassyouni, I. H., Emad, Y., Abd El-Wahab, G. A., Hamdy, G., and Mashahit, M. A. (2008). Cd4+cd25+ regulatory t cells (treg) in systemic lupus erythematosus (sle) patients: The possible influence of treatment with corticosteroids. *Clin Immunol*, 127(2):151–7.
- Azuma, T., Takahashi, T., Kunisato, A., Kitamura, T., and Hirai, H. (2003). Human cd4+ cd25+ regulatory t cells sup-

- press nkt cell functions. *Cancer Res*, 63(15):4516–20.
- Baecher-Allan, C., Brown, J. A., Freeman, G. J., and Hafler, D. A. (2001). Cd4+cd25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*, 167(3):1245–53.
- Baecher-Allan, C., Viglietta, V., and Hafler, D. A. (2004). Human cd4+cd25+ regulatory t cells. *Semin Immunol*, 16(2):89–98.
- Baechler, E. C., Batliwalla, F. M., Karypis, G., Gaffney, P. M., Ortmann, W. A., Espe, K. J., Shark, K. B., Grande, W. J., Hughes, K. M., Kapur, V., Gregersen, P. K., and Behrens, T. W. (2003). Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(5):2610–5.
- Baechler, E. C., Gregersen, P. K., and Behrens, T. W. (2004). The emerging role of interferon in human systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Immunol*, 16(6):801–7.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 18:767–811.
- Bastian, B. C., Nuss, B., Romisch, J., Kraus, M., and Brocker, E. B. (1994). Autoantibodies to annexins: A diagnostic marker for cutaneous disorders? *J Dermatol Sci*, 8(3):194–202.
- Bastian, B. C., Sellert, C., Seekamp, A., Romisch, J., Paques, E. P., and Brocker, E. B. (1993). Inhibition of human skin phospholipase a2 by "lipocortins" is an indirect effect of substrate/lipocortin interaction. *J Invest Dermatol*, 101(3):359–63.
- Baumann, I., Kolowos, W., Voll, R. E., Manger, B., Gaipl, U., Neuhuber, W. L., Kirchner, T., Kalden, J. R., and Herrmann, M. (2002). Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 46(1):191–201.
- Beebe, A. M., Cua, D. J., and de Waal Malefyt, R. (2002). The role of interleukin-10 in autoimmune disease: Systemic lupus erythematosus (sle) and multiple sclerosis (ms). *Cytokine Growth Factor Rev*, 13(4-5):403–12.
- Bencivelli, W., Vitali, C., Isenberg, D. A., Smolen, J. S., Snaith, M. L., Sciuto, M., and Bombardieri, S. (1992). Disease activity in systemic lupus erythematosus: Report of the consensus study group of the european workshop for rheumatology research. iii. development of a computerised clinical chart and its application to the comparison of different indices of disease activity. the european consensus study group for disease activity in sle. *Clin Exp Rheumatol*, 10(5):549–54.
- Bengtsson, A. A., Gullstrand, B., Truedsson, L., and Sturfelt, G. (2008). Sle serum induces classical caspase-dependent apoptosis independent of death receptors. *Clin Immunol*, 126(1):57–66.
- Bengtsson, A. A., Sturfelt, G., Gullstrand, B., and Truedsson, L. (2004). Induction of apoptosis in monocytes and lymphocytes by serum from patients with systemic lupus erythematosus - an additional mechanism to increased autoantigen load? *Clin Exp Immunol*, 135(3):535–43.
- Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F., and Ochs, H. D. (2001). The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked syn-

- drome (ipex) is caused by mutations of *foxp3*. *Nat Genet*, 27(1):20–1.
- Bennett, L., Palucka, A. K., Arce, E., Cantrell, V., Borvak, J., Banchereau, J., and Pascual, V. (2003). Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med*, 197(6):711–23.
- Benz, J. and Hofmann, A. (1997). Annexins: From structure to function. *Biol Chem*, 378(3-4):177–83.
- Berghofer, B., Frommer, T., Haley, G., Fink, L., Bein, G., and Hackstein, H. (2006). Tlr7 ligands induce higher ifn-alpha production in females. *J Immunol*, 177(4):2088–96.
- Bijl, M., Reefman, E., Horst, G., Limburg, P. C., and Kallenberg, C. G. (2006). Reduced uptake of apoptotic cells by macrophages in systemic lupus erythematosus: Correlates with decreased serum levels of complement. *Ann Rheum Dis*, 65(1):57–63.
- Binder, R. J., Han, D. K., and Srivastava, P. K. (2000). Cd91: A receptor for heat shock protein gp96. *Nat Immunol*, 1(2):151–5.
- Blanco, P., Palucka, A. K., Gill, M., Pascual, V., and Banchereau, J. (2001). Induction of dendritic cell differentiation by ifn-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science*, 294(5546):1540–3.
- Bonelli, M., Savitskaya, A., von Dalwigk, K., Steiner, C. W., Aletaha, D., Smolen, J. S., and Scheinecker, C. (2008). Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory t cells in patients with systemic lupus erythematosus (sle). *Int Immunol*, 20(7):861–8.
- Bouneaud, C., Kourilsky, P., and Bousso, P. (2000). Impact of negative selection on the t cell repertoire reactive to a self-peptide: A large fraction of t cell clones escapes clonal deletion. *Immunity*, 13(6):829–40.
- Brachvogel, B., Dikschas, J., Moch, H., Welzel, H., von der Mark, K., Hofmann, C., and Poschl, E. (2003). Annexin a5 is not essential for skeletal development. *Mol Cell Biol*, 23(8):2907–13.
- Brown, S., Heinisch, I., Ross, E., Shaw, K., Buckley, C. D., and Savill, J. (2002). Apoptosis disables cd31-mediated cell detachment from phagocytes promoting binding and engulfment. *Nature*, 418(6894):200–3.
- Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paeper, B., Clark, L. B., Yasayko, S. A., Wilkinson, J. E., Galas, D., Ziegler, S. F., and Ramsdell, F. (2001). Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*, 27(1):68–73.
- Byrne, A. and Reen, D. J. (2002). Lipopolysaccharide induces rapid production of il-10 by monocytes in the presence of apoptotic neutrophils. *J Immunol*, 168(4):1968–77.
- Casciola-Rosen, L. A., Anhalt, G., and Rosen, A. (1994). Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med*, 179(4):1317–30.
- Castro-Caldas, M., Duarte, C. B., Carvalho, A. P., and Lopes, M. C. (2002). Dexamethasone induces the secretion of annexin i in immature lymphoblastic cells by a calcium-dependent mechanism. *Mol Cell Biochem*, 237(1-2):31–8.
- Chang, C. C., Ciubotariu, R., Manavalan, J. S., Yuan, J., Colovai, A. I., Piazza,

- F., Lederman, S., Colonna, M., Cortesini, R., Dalla-Favera, R., and Suci-Foca, N. (2002). Tolerization of dendritic cells by t(s) cells: The crucial role of inhibitory receptors ilt3 and ilt4. *Nat Immunol*, 3(3):237–43.
- Chang, M. K., Bergmark, C., Laurila, A., Horkko, S., Han, K. H., Friedman, P., Dennis, E. A., and Witztum, J. L. (1999). Monoclonal antibodies against oxidized low-density lipoprotein bind to apoptotic cells and inhibit their phagocytosis by elicited macrophages: Evidence that oxidation-specific epitopes mediate macrophage recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(11):6353–8.
- Chen, C. H., Seguin-Devaux, C., Burke, N. A., Oriss, T. B., Watkins, S. C., Clipstone, N., and Ray, A. (2003). Transforming growth factor beta blocks tec kinase phosphorylation, ca^{2+} influx, and nfatc translocation causing inhibition of t cell differentiation. *J Exp Med*, 197(12):1689–99.
- Chen, W., Frank, M. E., Jin, W., and Wahl, S. M. (2001). Tgf-beta released by apoptotic t cells contributes to an immunosuppressive milieu. *Immunity*, 14(6):715–25.
- Cobbold, S. P., Castejon, R., Adams, E., Zelenika, D., Graca, L., Humm, S., and Waldmann, H. (2004). Induction of foxp3+ regulatory t cells in the periphery of t cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J Immunol*, 172(10):6003–10.
- Cohen, P. L., Caricchio, R., Abraham, V., Camenisch, T. D., Jennette, J. C., Roubey, R. A., Earp, H. S., Matsushima, G., and Reap, E. A. (2002). Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. *J Exp Med*, 196(1):135–40.
- Corthay, A. (2006). A three-cell model for activation of naive t helper cells. *Scand J Immunol*, 64(2):93–6.
- Costenbader, K. H., Feskanich, D., Stampfer, M. J., and Karlson, E. W. (2007). Reproductive and menopausal factors and risk of systemic lupus erythematosus in women. *Arthritis Rheum*, 56(4):1251–62.
- Courtney, P. A., Crockard, A. D., Williamson, K., Irvine, A. E., Kennedy, R. J., and Bell, A. L. (1999). Increased apoptotic peripheral blood neutrophils in systemic lupus erythematosus: Relations with disease activity, antibodies to double stranded dna, and neutropenia. *Ann Rheum Dis*, 58(5):309–14.
- Crow, M. K. and Wohlgemuth, J. (2003). Microarray analysis of gene expression in lupus. *Arthritis Res Ther*, 5(6):279–87.
- Cvetanovic, M. and Ucker, D. S. (2004). Innate immune discrimination of apoptotic cells: Repression of proinflammatory macrophage transcription is coupled directly to specific recognition. *J Immunol*, 172(2):880–9.
- Dall’era, M. C., Cardarelli, P. M., Preston, B. T., Witte, A., and Davis, J. C., J. (2005). Type i interferon correlates with serological and clinical manifestations of sle. *Ann Rheum Dis*, 64(12):1692–7.
- De Jager, P. L., Richardson, A., Vyse, T. J., and Rioux, J. D. (2006). Genetic variation in toll-like receptor 9 and susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 54(4):1279–82.
- Dean, G. S., Tyrrell-Price, J., Crawley, E., and Isenberg, D. A. (2000). Cytokines and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 59(4):243–51.

- Debret, R., El Btaouri, H., Duca, L., Rahman, I., Radke, S., Haye, B., Sallenne, J. M., and Antonicelli, F. (2003). Annexin a1 processing is associated with caspase-dependent apoptosis in bcr cells. *FEBS Lett*, 546(2-3):195–202.
- Della Gaspera, B., Braut-Boucher, F., Bomsel, M., Chatelet, F., Guguen-Guillouzo, C., Font, J., Weinman, J., and Weinman, S. (2001). Annexin expressions are temporally and spatially regulated during rat hepatocyte differentiation. *Dev Dyn*, 222(2):206–17.
- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., and Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol*, 2(11):1032–9.
- Devitt, A., Moffatt, O. D., Raykundalia, C., Capra, J. D., Simmons, D. L., and Gregory, C. D. (1998). Human cd14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature*, 392(6675):505–9.
- Dieckmann, D., Plottner, H., Berchtold, S., Berger, T., and Schuler, G. (2001). Ex vivo isolation and characterization of cd4+cd25+ t cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med*, 193(11):1303–10.
- Dörner, L. (2007). *Der Einfluss Von Apoptotischen Zellen Und Annexin 1 Auf Immunantwort Und Periphere Toleranz*. Doktorarbeit.
- Dreier, R., Schmid, K. W., Gerke, V., and Riehemann, K. (1998). Differential expression of annexins i, ii and iv in human tissues: An immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol*, 110(2):137–48.
- Droege, W. (1971). Amplifying and suppressive effect of thymus cells. *Nature*, 234(5331):549–51.
- Duncan, G. S., Peers, S. H., Carey, F., Forder, R., and Flower, R. J. (1993). The local anti-inflammatory action of dexamethasone in the rat carrageenin oedema model is reversed by an antiserum to lipocortin 1. *Br J Pharmacol*, 108(1):62–5.
- Ermann, J., Hoffmann, P., Edinger, M., Dutt, S., Blankenberg, F. G., Higgins, J. P., Negrin, R. S., Fathman, C. G., and Strober, S. (2005). Only the cd62l+ subpopulation of cd4+cd25+ regulatory t cells protects from lethal acute gvhd. *Blood*, 105(5):2220–6.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y., and Henson, P. M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving tgf-beta, pge2, and paf. *J Clin Invest*, 101(4):890–8.
- Fadok, V. A., Voelker, D. R., Campbell, P. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L., and Henson, P. M. (1992). Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol*, 148(7):2207–16.
- Fairhurst, A. M., Wandstrat, A. E., and Wakeland, E. K. (2006). Systemic lupus erythematosus: Multiple immunological phenotypes in a complex genetic disease. *Adv Immunol*, 92:1–69.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K. W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Fioretti, M. C., Alegre, M. L., and Puccetti, P. (2003). Modulation of tryptophan catabolism by regulatory t cells. *Nat Immunol*, 4(12):1206–12.
- Fantini, M. C., Becker, C., Monteleone, G., Pallone, F., Galle, P. R., and Neurath, J. (2004). Interleukin-10 is an essential regulator of the anti-inflammatory response in the gut. *Nat Immunol*, 5(11):1103–11.

- M. F. (2004). Cutting edge: Tgf-beta induces a regulatory phenotype in cd4+cd25- t cells through foxp3 induction and down-regulation of smad7. *J Immunol*, 172(9):5149–53.
- Faunce, D. E., Terajewicz, A., and Stein-Streilein, J. (2004). Cutting edge: In vitro-generated tolerogenic apc induce cd8+ t regulatory cells that can suppress ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 172(4):1991–5.
- Ferlazzo, V., D’Agostino, P., Milano, S., Caruso, R., Feo, S., Cillari, E., and Parente, L. (2003). Anti-inflammatory effects of annexin-1: Stimulation of il-10 release and inhibition of nitric oxide synthesis. *Int Immunopharmacol*, 3(10-11):1363–9.
- Folzenlogen, D., Hofer, M. F., Leung, D. Y., Freed, J. H., and Newell, M. K. (1997). Analysis of cd80 and cd86 expression on peripheral blood b lymphocytes reveals increased expression of cd86 in lupus patients. *Clin Immunol Immunopathol*, 83(3):199–204.
- Franc, N. C. (2002). Phagocytosis of apoptotic cells in mammals, caenorhabditis elegans and drosophila melanogaster: Molecular mechanisms and physiological consequences. *Front Biosci*, 7:d1298–313.
- Fu, S., Zhang, N., Yopp, A. C., Chen, D., Mao, M., Zhang, H., Ding, Y., and Bromberg, J. S. (2004). Tgf-beta induces foxp3 + t-regulatory cells from cd4 + cd25 - precursors. *Am J Transplant*, 4(10):1614–27.
- Gaipl, U. S., Munoz, L. E., Grossmayer, G., Lauber, K., Franz, S., Sarter, K., Voll, R. E., Winkler, T., Kuhn, A., Kal-den, J., Kern, P., and Herrmann, M. (2007). Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (sle). *J Autoimmun*, 28(2-3):114–21.
- Gao, Y., Herndon, J. M., Zhang, H., Griffith, T. S., and Ferguson, T. A. (1998). Antiinflammatory effects of cd95 ligand (fasl)-induced apoptosis. *J Exp Med*, 188(5):887–96.
- Gardai, S. J., McPhillips, K. A., Frasch, S. C., Janssen, W. J., Starefeldt, A., Murphy-Ullrich, J. E., Bratton, D. L., Oldenborg, P. A., Michalak, M., and Henson, P. M. (2005). Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of lrp on the phagocyte. *Cell*, 123(2):321–34.
- Gavins, F. N., Yona, S., Kamal, A. M., Flower, R. J., and Perretti, M. (2003). Leukocyte antiadhesive actions of annexin 1: Alxr- and fpr-related anti-inflammatory mechanisms. *Blood*, 101(10):4140–7.
- Gerke, V. and Moss, S. E. (2002). Annexins: From structure to function. *Physiol Rev*, 82(2):331–71.
- Gershon, R. K., Cohen, P., Hencin, R., and Liebhaver, S. A. (1972). Suppressor t cells. *J Immunol*, 108(3):586–90.
- Getting, S. J., Flower, R. J., and Perretti, M. (1997). Inhibition of neutrophil and monocyte recruitment by endogenous and exogenous lipocortin 1. *Br J Pharmacol*, 120(6):1075–82.
- Ghiringhelli, F., Menard, C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., Chaput, N., Puig, P. E., Novault, S., Escudier, B., Vivier, E., Lecesne, A., Robert, C., Blay, J. Y., Bernard, J., Caillat-Zucman, S., Freitas, A., Tursz, T., Wagner-Ballon, O., Capron, C., Vainchenker, W., Martin, F., and Zitvogel, L. (2005). Cd4+cd25+ regulatory t cells inhibit

- natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med*, 202(8):1075–85.
- Gladman, D. D., Goldsmith, C. H., Urowitz, M. B., Bacon, P., Bombardier, C., Isenberg, D., Kalunian, K., Liang, M. H., Maddison, P., Nived, O., and et al. (1992). Crosscultural validation and reliability of 3 disease activity indices in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol*, 19(4):608–11.
- Goodnow, C. C., Crosbie, J., Adelstein, S., Lavoie, T. B., Smith-Gill, S. J., Brink, R. A., Pritchard-Briscoe, H., Wotherpoon, J. S., Loblay, R. H., Raphael, K., and et al. (1988). Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive b lymphocytes in transgenic mice. *Nature*, 334(6184):676–82.
- Goulding, N. J., Podgorski, M. R., Hall, N. D., Flower, R. J., Browning, J. L., Pepinsky, R. B., and Maddison, P. J. (1989). Autoantibodies to recombinant lipocortin-1 in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 48(10):843–50.
- Gounari, F., Aifantis, I., Khazaie, K., Hofflinger, S., Harada, N., Taketo, M. M., and von Boehmer, H. (2001). Somatic activation of beta-catenin bypasses pre-tcr signaling and tcr selection in thymocyte development. *Nat Immunol*, 2(9):863–9.
- Grammer, A. C., Fischer, R., Lee, O., Zhang, X., and Lipsky, P. E. (2004). Flow cytometric assessment of the signaling status of human b lymphocytes from normal and autoimmune individuals. *Arthritis Res Ther*, 6(1):28–38.
- Green, D. R. and Reed, J. C. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281(5381):1309–12.
- Greenwald, R. J., Freeman, G. J., and Sharpe, A. H. (2005). The b7 family revisited. *Annu Rev Immunol*, 23:515–48.
- Grondal, G., Traustadottir, K. H., Kristjansdottir, H., Lundberg, I., Klareskog, L., Erlendsson, K., and Steinsson, K. (2002). Increased t-lymphocyte apoptosis/necrosis and il-10 producing cells in patients and their spouses in icelandic systemic lupus erythematosus multicausal families. *Lupus*, 11(7):435–42.
- Gullstrand, B., Martensson, U., Sturfelt, G., Bengtsson, A. A., and Truedsson, L. (2009). Complement classical pathway components are all important in clearance of apoptotic and secondary necrotic cells. *Clin Exp Immunol*, 156(2):303–11.
- Han, G. M., Chen, S. L., Shen, N., Ye, S., Bao, C. D., and Gu, Y. Y. (2003). Analysis of gene expression profiles in human systemic lupus erythematosus using oligonucleotide microarray. *Genes Immun*, 4(3):177–86.
- Hanayama, R., Tanaka, M., Miyasaka, K., Aozasa, K., Koike, M., Uchiyama, Y., and Nagata, S. (2004). Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in mfg-e8-deficient mice. *Science*, 304(5674):1147–50.
- Hanley, P. J., Musset, B., Renigunta, V., Limberg, S. H., Dalpke, A. H., Sus, R., Heeg, K. M., Preisig-Muller, R., and Daut, J. (2004). Extracellular atp induces oscillations of intracellular ca²⁺ and membrane potential and promotes transcription of il-6 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(25):9479–84.
- Hannon, R., Croxtall, J. D., Getting, S. J., Roviezzo, F., Yona, S., Paul-Clark, M. J., Gavins, F. N., Perretti, M., Morris, J. F., Buckingham, J. C., and Flower, R. J. (2003). Aberrant inflammation and resistance to glucocor-

- ticoids in annexin 1-/- mouse. *Faseb J*, 17(2):253–5.
- Harris, E. N. (1990). Maternal autoantibodies and pregnancy-i: The antiphospholipid antibody syndrome. *Baillieres Clin Rheumatol*, 4(1):53–68.
- Hartigan-O'Connor, D. J., Poon, C., Sinclair, E., and McCune, J. M. (2007). Human cd4+ regulatory t cells express lower levels of the il-7 receptor alpha chain (cd127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J Immunol Methods*, 319(1-2):41–52.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J. V., Steinman, R. M., and Nussenzweig, M. C. (2001). Dendritic cells induce peripheral t cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med*, 194(6):769–79.
- Hawkins, T. E., Roes, J., Rees, D., Monkhouse, J., and Moss, S. E. (1999). Immunological development and cardiovascular function are normal in annexin vi null mutant mice. *Mol Cell Biol*, 19(12):8028–32.
- Hepburn, A. L. (2001). The le cell. *Rheumatology (Oxford)*, 40(7):826–7.
- Herr, C., Smyth, N., Ullrich, S., Yun, F., Sasse, P., Hescheler, J., Fleischmann, B., Lasek, K., Brixius, K., Schwinger, R. H., Fassler, R., Schroder, R., and Noegel, A. A. (2001). Loss of annexin a7 leads to alterations in frequency-induced shortening of isolated murine cardiomyocytes. *Mol Cell Biol*, 21(13):4119–28.
- Herrmann, M., Voll, R. E., Zoller, O. M., Hagenhofer, M., Ponner, B. B., and Kal-den, J. R. (1998). Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 41(7):1241–50.
- Hochberg, M. C. (1997). Updating the american college of rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 40(9):1725.
- Hooks, J. J., Moutsopoulos, H. M., Geis, S. A., Stahl, N. I., Decker, J. L., and Notkins, A. L. (1979). Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease. *N Engl J Med*, 301(1):5–8.
- Huang, F. P., Platt, N., Wykes, M., Major, J. R., Powell, T. J., Jenkins, C. D., and MacPherson, G. G. (2000). A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to t cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med*, 191(3):435–44.
- Hur, J. W., Shin, H. D., Park, B. L., Kim, L. H., Kim, S. Y., and Bae, S. C. (2005). Association study of toll-like receptor 9 gene polymorphism in korean patients with systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens*, 65(3):266–70.
- Ip, W. K. and Lau, Y. L. (2004). Distinct maturation of, but not migration between, human monocyte-derived dendritic cells upon ingestion of apoptotic cells of early or late phases. *J Immunol*, 173(1):189–96.
- Isenberg, D., Gordon, C., Merrill, J., and Urowitz, M. (2008). New therapies in systemic lupus erythematosus - trials, troubles and tribulations... working towards a solution. *Lupus*, 17(11):967–70.
- Jandl, R. C., George, J. L., Dinarello, C. A., and Schur, P. H. (1987). The effect of interleukin 1 on igg synthesis in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol*, 45(3):384–94.
- Janeway, C. A., J. (1989). Approaching the asymptote? evolution and revolution

- in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 54 Pt 1:1–13.
- Janeway, C. A., J. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today*, 13(1):11–6.
- Janicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R., and Porter, A. G. (1998). Caspase-3 is required for dna fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem*, 273(16):9357–60.
- Jin, O., Kavikondala, S., Sun, L., Fu, R., Mok, M. Y., Chan, A., Yeung, J., and Lau, C. S. (2008). Systemic lupus erythematosus patients have increased number of circulating plasmacytoid dendritic cells, but decreased myeloid dendritic cells with deficient cd83 expression. *Lupus*, 17(7):654–62.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Kakirman, H., Stassen, M., Knop, J., and Enk, A. H. (2002). Infectious tolerance: Human cd25+ regulatory t cells convey suppressor activity to conventional cd4+ t helper cells. *J Exp Med*, 196(2):255–60.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J., and Enk, A. H. (2000). Induction of interleukin 10-producing, non-proliferating cd4+ t cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med*, 192(9):1213–22.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., and Enk, A. H. (2001). Identification and functional characterization of human cd4(+)cd25(+) t cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med*, 193(11):1285–94.
- Jordan, M. S., Boesteanu, A., Reed, A. J., Petrone, A. L., Holenbeck, A. E., Lerman, M. A., Najj, A., and Caton, A. J. (2001). Thymic selection of cd4+cd25+ regulatory t cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol*, 2(4):301–6.
- Kawai, M. and Szegedi, G. (2007). Immune complex clearance by monocytes and macrophages in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*, 6(7):497–502.
- Kawahata, K., Misaki, Y., Yamauchi, M., Tsunekawa, S., Setoguchi, K., Miyazaki, J., and Yamamoto, K. (2002). Generation of cd4+cd25+ regulatory t cells from autoreactive t cells simultaneously with their negative selection in the thymus and from nonautoreactive t cells by endogenous tcr expression. *J Immunol*, 168(9):4399–405.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4):239–57.
- Kim, S., Elkon, K. B., and Ma, X. (2004). Transcriptional suppression of interleukin-12 gene expression following phagocytosis of apoptotic cells. *Immunity*, 21(5):643–53.
- Kirou, K. A., Lee, C., George, S., Louca, K., Papagiannis, I. G., Peterson, M. G., Ly, N., Woodward, R. N., Fry, K. E., Lau, A. Y., Prentice, J. G., Wohlgemuth, J. G., and Crow, M. K. (2004). Coordinate overexpression of interferon-alpha-induced genes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 50(12):3958–67.
- Kirou, K. A., Lee, C., George, S., Louca, K., Peterson, M. G., and Crow, M. K. (2005). Activation of the interferon-alpha pathway identifies a subgroup of systemic lupus erythematosus patients with distinct serologic features and active disease. *Arthritis Rheum*, 52(5):1491–503.

- Klein, S. (2007). *Charakterisierung Regulatorischer T-Zellen Bei Verschiedenen Formen Der Sklerodermie*. Diplomarbeit.
- Kleinewietfeld, M., Puentes, F., Borsellino, G., Battistini, L., Rotzschke, O., and Falk, K. (2005). Ccr6 expression defines regulatory effector/memory-like cells within the cd25+cd4+ t-cell subset. *Blood*, 105(7):2877–86.
- Klinman, D. M., Shirai, A., Ishigatsubo, Y., Conover, J., and Steinberg, A. D. (1991). Quantitation of igm- and igg-secreting b cells in the peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 34(11):1404–10.
- Klint, C., Truedsson, L., Andreasson, A., Johansson, I., and Sturfelt, G. (2000). Toxic effects of sle serum on normal monocytes in vitro: Cell death induced by apoptosis related to complement dysfunction. *Lupus*, 9(4):278–87.
- Koenen, H. J., Fasse, E., and Joosten, I. (2005). Cd27/cfse-based ex vivo selection of highly suppressive alloantigen-specific human regulatory t cells. *J Immunol*, 174(12):7573–83.
- Kuhn, A. and Beissert, S. (2005). Photosensitivity in lupus erythematosus. *Autoimmunity*, 38(7):519–29.
- Kuhn, A., Beissert, S., and Krammer, P. H. (2009). Cd4+cd25+ regulatory t cells in human lupus erythematosus. *Arch Dermatol Res*, 301(1):71–81.
- Kuhn, A., Sticherling, M., and Bonsmann, G. (2007). Clinical manifestations of cutaneous lupus erythematosus. *J Dtsch Dermatol Ges*, 5(12):1124–37.
- Kurts, C., Kosaka, H., Carbone, F. R., Miller, J. F., and Heath, W. R. (1997). Class i-restricted cross-presentation of exogenous self-antigens leads to deletion of autoreactive cd8(+) t cells. *J Exp Med*, 186(2):239–45.
- Kurts, C., Sutherland, R. M., Davey, G., Li, M., Lew, A. M., Blanas, E., Carbone, F. R., Miller, J. F., and Heath, W. R. (1999). Cd8 t cell ignorance or tolerance to islet antigens depends on antigen dose. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(22):12703–7.
- Kyewski, B. and Derbinski, J. (2004). Self-representation in the thymus: An extended view. *Nat Rev Immunol*, 4(9):688–98.
- Kyewski, B. and Klein, L. (2006). A central role for central tolerance. *Annu Rev Immunol*, 24:571–606.
- Laborde, E. A., Vanzulli, S., Beigier-Bompadre, M., Isturiz, M. A., Ruggiero, R. A., Fourcade, M. G., Catalan Pellet, A. C., Sozzani, S., and Vulcano, M. (2007). Immune complexes inhibit differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 179(1):673–81.
- Lahl, K., Loddenkemper, C., Drouin, C., Freyer, J., Arnason, J., Eberl, G., Hamann, A., Wagner, H., Huehn, J., and Sparwasser, T. (2007). Selective depletion of foxp3+ regulatory t cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med*, 204(1):57–63.
- Landry, M. (1977). Phagocyte function and cell-mediated immunity in systemic lupus erythematosus. *Arch Dermatol*, 113(2):147–54.
- Lasker, M. V. and Nair, S. K. (2006). Intracellular tlr signaling: A structural perspective on human disease. *J Immunol*, 177(1):11–6.
- Lauber, K., Bohn, E., Krober, S. M., Xiao, Y. J., Blumenthal, S. G., Lindemann,

- R. K., Marini, P., Wiedig, C., Zobywalski, A., Baksh, S., Xu, Y., Autenrieth, I. B., Schulze-Osthoff, K., Belka, C., Stuhler, G., and Wesselborg, S. (2003). Apoptotic cells induce migration of phagocytes via caspase-3-mediated release of a lipid attraction signal. *Cell*, 113(6):717–30.
- Lavrik, I., Krueger, A., Schmitz, I., Baumann, S., Weyd, H., Krammer, P. H., and Kirchhoff, S. (2003). The active caspase-8 heterotetramer is formed at the cd95 disc. *Cell Death Differ*, 10(1):144–5.
- Lee, J. W., Epardaud, M., Sun, J., Becker, J. E., Cheng, A. C., Yonekura, A. R., Heath, J. K., and Turley, S. J. (2007). Peripheral antigen display by lymph node stroma promotes t cell tolerance to intestinal self. *Nat Immunol*, 8(2):181–90.
- Levings, M. K., Sangregorio, R., and Roncarolo, M. G. (2001). Human cd25+cd4+ t regulatory cells suppress naive and memory t cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med*, 193(11):1295–302.
- Lim, H. W., Hillsamer, P., Banham, A. H., and Kim, C. H. (2005). Cutting edge: Direct suppression of b cells by cd4+cd25+ regulatory t cells. *J Immunol*, 175(7):4180–3.
- Lin, S. C., Chen, K. H., Lin, C. H., Kuo, C. C., Ling, Q. D., and Chan, C. H. (2007). The quantitative analysis of peripheral blood foxp3-expressing t cells in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis patients. *Eur J Clin Invest*, 37(12):987–96.
- Linker-Israeli, M., Deans, R. J., Wallace, D. J., Prehn, J., Ozeri-Chen, T., and Klinenberg, J. R. (1991). Elevated levels of endogenous il-6 in systemic lupus erythematosus. a putative role in pathogenesis. *J Immunol*, 147(1):117–23.
- Liou, S. N., Kovacs, B., Dennis, G., Kammer, G. M., and Tsokos, G. C. (1996). B cells from patients with systemic lupus erythematosus display abnormal antigen receptor-mediated early signal transduction events. *J Clin Invest*, 98(11):2549–57.
- Lit, L. C., Wong, C. K., Tam, L. S., Li, E. K., and Lam, C. W. (2006). Raised plasma concentration and ex vivo production of inflammatory chemokines in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 65(2):209–15.
- Liu, L., Fisher, A. B., and Zimmerman, U. J. (1995). Regulation of annexin i by proteolysis in rat alveolar epithelial type ii cells. *Biochem Mol Biol Int*, 36(2):373–81.
- Liu, W., Putnam, A. L., Xu-Yu, Z., Szot, G. L., Lee, M. R., Zhu, S., Gottlieb, P. A., Kapranov, P., Gingeras, T. R., Fazekas de St Groth, B., Clayberger, C., Soper, D. M., Ziegler, S. F., and Bluestone, J. A. (2006). Cd127 expression inversely correlates with foxp3 and suppressive function of human cd4+ t reg cells. *J Exp Med*, 203(7):1701–11.
- Lohr, J., Knoechel, B., Jiang, S., Sharpe, A. H., and Abbas, A. K. (2003). The inhibitory function of b7 costimulators in t cell responses to foreign and self-antigens. *Nat Immunol*, 4(7):664–9.
- Lovgren, T., Eloranta, M. L., Bave, U., Alm, G. V., and Ronnblom, L. (2004). Induction of interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus igg. *Arthritis Rheum*, 50(6):1861–72.

- Lutz, M. B. and Schuler, G. (2002). Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: Which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol*, 23(9):445–9.
- Macian, F., Im, S. H., Garcia-Cozar, F. J., and Rao, A. (2004). T-cell anergy. *Curr Opin Immunol*, 16(2):209–16.
- Mahnke, K., Schonfeld, K., Fondel, S., Ring, S., Karakhanova, S., Wiedemeyer, K., Bedke, T., Johnson, T. S., Storn, V., Schallenberg, S., and Enk, A. H. (2007). Depletion of cd4+cd25+ human regulatory t cells in vivo: Kinetics of treg depletion and alterations in immune functions in vivo and in vitro. *Int J Cancer*, 120(12):2723–33.
- Masaki, T., Tokuda, M., Fujimura, T., Ohnishi, M., Tai, Y., Miyamoto, K., Itano, T., Matsui, H., Watanabe, S., Sogawa, K., and et al. (1994). Involvement of annexin i and annexin ii in hepatocyte proliferation: Can annexins i and ii be markers for proliferative hepatocytes? *Hepatology*, 20(2):425–35.
- Masi, A. T. and Kaslow, R. A. (1978). Sex effects in systemic lupus erythematosus: A clue to pathogenesis. *Arthritis Rheum*, 21(4):480–4.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol*, 12:991–1045.
- McGuirk, P., McCann, C., and Mills, K. H. (2002). Pathogen-specific t regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: A novel strategy for evasion of protective t helper type 1 responses by bordetella pertussis. *J Exp Med*, 195(2):221–31.
- Means, T. K., Latz, E., Hayashi, F., Murali, M. R., Golenbock, D. T., and Luster, A. D. (2005). Human lupus autoantibody-dna complexes activate dcs through cooperation of cd32 and tlr9. *J Clin Invest*, 115(2):407–17.
- Mehta, N. D., Hooberman, A. L., Vokes, E. E., Neeley, S., and Cotler, S. (1992). 35-year-old patient with chronic myelogenous leukemia developing systemic lupus erythematosus after alpha-interferon therapy. *Am J Hematol*, 41(2):141.
- Menges, M., Rossner, S., Voigtlander, C., Schindler, H., Kukutsch, N. A., Bogdan, C., Erb, K., Schuler, G., and Lutz, M. B. (2002). Repetitive injections of dendritic cells matured with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J Exp Med*, 195(1):15–21.
- Miele, L. (2000). Antiflammins. bioactive peptides derived from uteroglobin. *Ann N Y Acad Sci*, 923:128–40.
- Min, W. P., Zhou, D., Ichim, T. E., Strejan, G. H., Xia, X., Yang, J., Huang, X., Garcia, B., White, D., Dutartre, P., Jevnikar, A. M., and Zhong, R. (2003). Inhibitory feedback loop between tolerogenic dendritic cells and regulatory t cells in transplant tolerance. *J Immunol*, 170(3):1304–12.
- Misra, N., Bayry, J., Lacroix-Desmazes, S., Kazatchkine, M. D., and Kaveri, S. V. (2004). Cutting edge: Human cd4+cd25+ t cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells. *J Immunol*, 172(8):4676–80.
- Miyake, K., Nakashima, H., Akahoshi, M., Inoue, Y., Nagano, S., Tanaka, Y., Matsutani, K., Hirakata, H., Gondo, H., Otsuka, T., and Harada, M. (2002). Genetically determined interferon-gamma production influences the histological

- phenotype of lupus nephritis. *Rheumatology (Oxford)*, 41(5):518–24.
- Miyara, M., Amoura, Z., Parizot, C., Badoual, C., Dorgham, K., Trad, S., Nochy, D., Debre, P., Piette, J. C., and Gorochoy, G. (2005). Global natural regulatory t cell depletion in active systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 175(12):8392–400.
- Moffatt, O. D., Devitt, A., Bell, E. D., Simmons, D. L., and Gregory, C. D. (1999). Macrophage recognition of icam-3 on apoptotic leukocytes. *J Immunol*, 162(11):6800–10.
- Mok, C. C. and Lau, C. S. (2003). Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *J Clin Pathol*, 56(7):481–90.
- Mok, M. Y., Jack, D. L., Lau, C. S., Fong, D. Y., Turner, M. W., Isenberg, D. A., and Lydyard, P. M. (2004). Antibodies to mannanose binding lectin in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 13(7):522–8.
- Monneaux, F. and Muller, S. (2002). Epitope spreading in systemic lupus erythematosus: Identification of triggering peptide sequences. *Arthritis Rheum*, 46(6):1430–8.
- Morand, E. F., Hutchinson, P., Hargreaves, A., Goulding, N. J., Boyce, N. W., and Holdsworth, S. R. (1995). Detection of intracellular lipocortin 1 in human leukocyte subsets. *Clin Immunol Immunopathol*, 76(2):195–202.
- Morgan, R. O. and Fernandez, M. P. (1997). Annexin gene structures and molecular evolutionary genetics. *Cell Mol Life Sci*, 53(6):508–15.
- Morse, M. A., Hobeika, A. C., Osada, T., Serra, D., Niedzwiecki, D., Lysterly, H. K., and Clay, T. M. (2008). Depletion of human regulatory t cells specifically enhances antigen-specific immune responses to cancer vaccines. *Blood*, 112(3):610–8.
- Movitz, C. and Dahlgren, C. (2000). Endogenous cleavage of annexin i generates a truncated protein with a reduced calcium requirement for binding to neutrophil secretory vesicles and plasma membrane. *Biochim Biophys Acta*, 1468(1–2):231–8.
- Nagahama, M., Nomura, S., Ozaki, Y., Yoshimura, C., Kagawa, H., and Fukushima, S. (2001). Platelet activation markers and soluble adhesion molecules in patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity*, 33(2):85–94.
- Nakamura, K., Kitani, A., Fuss, I., Pedersen, A., Harada, N., Nawata, H., and Strober, W. (2004). Tgf-beta 1 plays an important role in the mechanism of cd4+cd25+ regulatory t cell activity in both humans and mice. *J Immunol*, 172(2):834–42.
- Nath, S. K., Harley, J. B., and Lee, Y. H. (2005). Polymorphisms of complement receptor 1 and interleukin-10 genes and systemic lupus erythematosus: A meta-analysis. *Hum Genet*, 118(2):225–34.
- Ng, M. W., Lau, C. S., Chan, T. M., Wong, W. H., and Lau, Y. L. (2005). Polymorphisms of the toll-like receptor 9 (tlr9) gene with systemic lupus erythematosus in chinese. *Rheumatology (Oxford)*, 44(11):1456–7.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., and Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, 139(2):271–9.

- Nishizuka, Y. and Sakakura, T. (1969). Thymus and reproduction: Sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science*, 166(906):753–5.
- Ogden, C. A., deCathelineau, A., Hoffmann, P. R., Bratton, D., Ghebrehiwet, B., Fadok, V. A., and Henson, P. M. (2001). C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and cd91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med*, 194(6):781–95.
- Parnaik, R., Raff, M. C., and Scholes, J. (2000). Differences between the clearance of apoptotic cells by professional and non-professional phagocytes. *Curr Biol*, 10(14):857–60.
- Perniok, A., Wedekind, F., Herrmann, M., Specker, C., and Schneider, M. (1998). High levels of circulating early apoptic peripheral blood mononuclear cells in systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 7(2):113–8.
- Perretti, M., Ahluwalia, A., Harris, J. G., Goulding, N. J., and Flower, R. J. (1993). Lipocortin-1 fragments inhibit neutrophil accumulation and neutrophil-dependent edema in the mouse. a qualitative comparison with an anti-cd11b monoclonal antibody. *J Immunol*, 151(8):4306–14.
- Perretti, M., Getting, S. J., Solito, E., Murphy, P. M., and Gao, J. L. (2001). Involvement of the receptor for formylated peptides in the in vivo anti-migratory actions of annexin 1 and its mimetics. *Am J Pathol*, 158(6):1969–73.
- Peter, M. E. and Krammer, P. H. (2003). The cd95(apo-1/fas) disc and beyond. *Cell Death Differ*, 10(1):26–35.
- Petry, F. (1998). Molecular basis of hereditary c1q deficiency. *Immunobiology*, 199(2):286–94.
- Piccirillo, C. A. and Shevach, E. M. (2001). Cutting edge: Control of cd8+ t cell activation by cd4+cd25+ immunoregulatory cells. *J Immunol*, 167(3):1137–40.
- Rao, P. E., Petrone, A. L., and Ponath, P. D. (2005). Differentiation and expansion of t cells with regulatory function from human peripheral lymphocytes by stimulation in the presence of tgf-Beta. *J Immunol*, 174(3):1446–55.
- Rasku, M. A., Clem, A. L., Telang, S., Taft, B., Gettings, K., Gragg, H., Cramer, D., Lear, S. C., McMasters, K. M., Miller, D. M., and Chesney, J. (2008). Transient t cell depletion causes regression of melanoma metastases. *J Transl Med*, 6:12.
- Raynal, P., Hullin, F., Ragab-Thomas, J. M., Fauvel, J., and Chap, H. (1993). Annexin 5 as a potential regulator of annexin 1 phosphorylation by protein kinase c. in vitro inhibition compared with quantitative data on annexin distribution in human endothelial cells. *Biochem J*, 292 (Pt 3):759–65.
- Read, S., Malmstrom, V., and Powrie, F. (2000). Cytotoxic t lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of cd25(+)cd4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med*, 192(2):295–302.
- Reddy, J., Waldner, H., Zhang, X., Illes, Z., Wucherpfennig, K. W., Sobel, R. A., and Kuchroo, V. K. (2005). Cutting edge: Cd4+cd25+ regulatory t cells contribute to gender differences in susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*, 175(9):5591–5.

- Ren, Y., Tang, J., Mok, M. Y., Chan, A. W., Wu, A., and Lau, C. S. (2003). Increased apoptotic neutrophils and macrophages and impaired macrophage phagocytic clearance of apoptotic neutrophils in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 48(10):2888–97.
- Riboldi, P., Gerosa, M., Moroni, G., Radice, A., Allegri, F., Sinico, A., Tincani, A., and Meroni, P. L. (2005). Anti-dna antibodies: A diagnostic and prognostic tool for systemic lupus erythematosus? *Autoimmunity*, 38(1):39–45.
- Riess, D. (2006). *Untersuchungen Zur Externalisierung Von Annexin I Während Der Apoptose*. Doktorarbeit.
- Ronnblom, L. and Alm, G. V. (2001). A pivotal role for the natural interferon alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in the pathogenesis of lupus. *J Exp Med*, 194(12):F59–63.
- Ronnblom, L. E., Alm, G. V., and Oberg, K. (1991a). Autoimmune phenomena in patients with malignant carcinoid tumors during interferon-alpha treatment. *Acta Oncol*, 30(4):537–40.
- Ronnblom, L. E., Alm, G. V., and Oberg, K. E. (1991b). Autoimmunity after alpha-interferon therapy for malignant carcinoid tumors. *Ann Intern Med*, 115(3):178–83.
- Ronnellid, J., Tejde, A., Mathsson, L., Nilsson-Ekdahl, K., and Nilsson, B. (2003). Immune complexes from sle sera induce il10 production from normal peripheral blood mononuclear cells by an fcγmarii dependent mechanism: Implications for a possible vicious cycle maintaining b cell hyperactivity in sle. *Ann Rheum Dis*, 62(1):37–42.
- Rosen, A. and Casciola-Rosen, L. (1999). Autoantigens as substrates for apoptotic proteases: Implications for the pathogenesis of systemic autoimmune disease. *Cell Death Differ*, 6(1):6–12.
- Rosengarth, A., Gerke, V., and Luecke, H. (2001). X-ray structure of full-length annexin 1 and implications for membrane aggregation. *J Mol Biol*, 306(3):489–98.
- Rousset, F., Peyrol, S., Garcia, E., Vezio, N., Andujar, M., Grimaud, J. A., and Banchereau, J. (1995). Long-term cultured cd40-activated b lymphocytes differentiate into plasma cells in response to il-10 but not il-4. *Int Immunol*, 7(8):1243–53.
- Roviezzo, F., Getting, S. J., Paul-Clark, M. J., Yona, S., Gavins, F. N., Perretti, M., Hannon, R., Croxtall, J. D., Buckingham, J. C., and Flower, R. J. (2002). The annexin-1 knockout mouse: What it tells us about the inflammatory response. *J Physiol Pharmacol*, 53(4 Pt 1):541–53.
- Rovin, B. H., Lu, L., and Zhang, X. (2002). A novel interleukin-8 polymorphism is associated with severe systemic lupus erythematosus nephritis. *Kidney Int*, 62(1):261–5.
- Ruffatti, A., Calligaro, A., Del Ross, T., Bertoli, M. T., Doria, A., Rossi, L., and Todesco, S. (1990). Anti-double-stranded dna antibodies in the healthy elderly: Prevalence and characteristics. *J Clin Immunol*, 10(6):300–3.
- Ruprecht, C. R., Gattorno, M., Ferlito, F., Gregorio, A., Martini, A., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2005). Coexpression of cd25 and cd27 identifies foxp3+ regulatory t cells in inflamed synovia. *J Exp Med*, 201(11):1793–803.
- Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising cd4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*, 22:531–62.

- Sakaguchi, S., Hori, S., Fukui, Y., Sasazuki, T., Sakaguchi, N., and Takahashi, T. (2003). Thymic generation and selection of cd25+cd4+ regulatory t cells: Implications of their broad repertoire and high self-reactivity for the maintenance of immunological self-tolerance. *Novartis Found Symp*, 252:6–16; discussion 16–23, 106–14.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated t cells expressing il-2 receptor alpha-chains (cd25). breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 155(3):1151–64.
- Sakaguchi, S., Toda, M., Asano, M., Itoh, M., Morse, S. S., and Sakaguchi, N. (1996). T cell-mediated maintenance of natural self-tolerance: Its breakdown as a possible cause of various autoimmune diseases. *J Autoimmun*, 9(2):211–20.
- Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*, 179(4):1109–18.
- Salmon, J. E., Kimberly, R. P., Gibofsky, A., and Fotino, M. (1984). Defective mononuclear phagocyte function in systemic lupus erythematosus: Dissociation of fc receptor-ligand binding and internalization. *J Immunol*, 133(5):2525–31.
- Sampaio, E. P., Sarno, E. N., Galilly, R., Cohn, Z. A., and Kaplan, G. (1991). Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med*, 173(3):699–703.
- Savill, J., Fadok, V., Henson, P., and Hallett, C. (1993). Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today*, 14(3):131–6.
- Scaffidi, P., Misteli, T., and Bianchi, M. E. (2002). Release of chromatin protein hmgb1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 418(6894):191–5.
- Schilling, P. J., Kurzrock, R., Kantarjian, H., Gutterman, J. U., and Talpaz, M. (1991). Development of systemic lupus erythematosus after interferon therapy for chronic myelogenous leukemia. *Cancer*, 68(7):1536–7.
- Schneider, U. and Schwenk, H. U. (1977). Characterization of t and non-t-cell lines established from children with acute lymphoblastic leukemia and non-hodgkin lymphoma after leukemic transformation. *Haematol Blood Transfus*, 20:265–9.
- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S. I., Nanan, R., Kelleher, A., and Fazekas de St Groth, B. (2006). Expression of interleukin (il)-2 and il-7 receptors discriminates between human regulatory and activated t cells. *J Exp Med*, 203(7):1693–700.
- Sen, P., Wallet, M. A., Yi, Z., Huang, Y., Henderson, M., Mathews, C. E., Earp, H. S., Matsushima, G., Baldwin, A. S., J., and Tisch, R. M. (2007). Apoptotic cells induce mer tyrosine kinase-dependent blockade of nf-kappab activation in dendritic cells. *Blood*, 109(2):653–60.
- Shi, Y., Evans, J. E., and Rock, K. L. (2003). Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature*, 425(6957):516–21.

- Shortman, K., Egerton, M., Spangrude, G. J., and Scollay, R. (1990). The generation and fate of thymocytes. *Semin Immunol*, 2(1):3–12.
- Shoshan, Y., Shapira, I., Toubi, E., Frolkis, I., Yaron, M., and Mevorach, D. (2001). Accelerated fas-mediated apoptosis of monocytes and maturing macrophages from patients with systemic lupus erythematosus: Relevance to in vitro impairment of interaction with ic3b-opsonized apoptotic cells. *J Immunol*, 167(10):5963–9.
- Solito, E., Nuti, S., and Parente, L. (1994). Dexamethasone-induced translocation of lipocortin (annexin) 1 to the cell membrane of u-937 cells. *Br J Pharmacol*, 112(2):347–8.
- Stuart, L. M., Lucas, M., Simpson, C., Lamb, J., Savill, J., and Lacy-Hulbert, A. (2002). Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. *J Immunol*, 168(4):1627–35.
- Suarez, A., Lopez, P., Gomez, J., and Gutierrez, C. (2006). Enrichment of cd4+cd25high t cell population in patients with systemic lupus erythematosus treated with glucocorticoids. *Ann Rheum Dis*, 65(11):1512–7.
- Suh, C. H., Chun, H. Y., Ye, Y. M., and Park, H. S. (2006). Unresponsiveness of c-reactive protein in the non-infectious inflammation of systemic lupus erythematosus is associated with interleukin 6. *Clin Immunol*, 119(3):291–6.
- Sundstrom, C. and Nilsson, K. (1976). Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (u-937). *Int J Cancer*, 17(5):565–77.
- Suri-Payer, E., Amar, A. Z., Thornton, A. M., and Shevach, E. M. (1998). Cd4+cd25+ t cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive t cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells. *J Immunol*, 160(3):1212–8.
- Suvas, S., Kumaraguru, U., Pack, C. D., Lee, S., and Rouse, B. T. (2003). Cd4+cd25+ t cells regulate virus-specific primary and memory cd8+ t cell responses. *J Exp Med*, 198(6):889–901.
- Tan, E. M., Cohen, A. S., Fries, J. F., Masi, A. T., McShane, D. J., Rothfield, N. F., Schaller, J. G., Talal, N., and Winchester, R. J. (1982). The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 25(11):1271–7.
- Tan, E. M., Feltkamp, T. E., Smolen, J. S., Butcher, B., Dawkins, R., Fritzler, M. J., Gordon, T., Hardin, J. A., Kalden, J. R., Lahita, R. G., Maini, R. N., McDougal, J. S., Rothfield, N. F., Smeenk, R. J., Takasaki, Y., Wiik, A., Wilson, M. R., and Koziol, J. A. (1997). Range of anti-nuclear antibodies in "healthy" individuals. *Arthritis Rheum*, 40(9):1601–11.
- Tan, E. M. and Kunkel, H. G. (2006). Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *J. immunol.* 1966. 96: 464-471. *J Immunol*, 176(3):1297–304.
- Tanaka, Y., Shirakawa, F., Ota, T., Suzuki, H., Eto, S., and Yamashita, U. (1988). Mechanism of spontaneous activation of b cells in patients with systemic lupus erythematosus. analysis with anti-class ii antibody. *J Immunol*, 140(3):761–7.
- Tebbe, B. and Orfanos, C. E. (1997). Epidemiology and socioeconomic impact of skin disease in lupus erythematosus. *Lupus*, 6(2):96–104.

- Thornton, A. M. and Shevach, E. M. (1998). Cd4+cd25+ immunoregulatory t cells suppress polyclonal t cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med*, 188(2):287–96.
- Thornton, A. M. and Shevach, E. M. (2000). Suppressor effector function of cd4+cd25+ immunoregulatory t cells is antigen nonspecific. *J Immunol*, 164(1):183–90.
- Thumb, N. (2001). *Praktische Rheumatologie*. Springer, Heidelberg, 4 edition.
- Tritt, M., Sgouroudis, E., d’Hennezel, E., Albanese, A., and Piccirillo, C. A. (2008). Functional waning of naturally occurring cd4+ regulatory t-cells contributes to the onset of autoimmune diabetes. *Diabetes*, 57(1):113–23.
- Tyrrell-Price, J., Lydyard, P. M., and Isenberg, D. A. (2001). The effect of interleukin-10 and of interleukin-12 on the in vitro production of anti-double-stranded dna antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*, 124(1):118–25.
- Valencia, X., Yarboro, C., Illei, G., and Lipsky, P. E. (2007). Deficient cd4+cd25high t regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 178(4):2579–88.
- Vallin, H., Blomberg, S., Alm, G. V., Cederblad, B., and Ronnblom, L. (1999a). Patients with systemic lupus erythematosus (sle) have a circulating inducer of interferon-alpha (ifn-alpha) production acting on leucocytes resembling immature dendritic cells. *Clin Exp Immunol*, 115(1):196–202.
- Vallin, H., Perers, A., Alm, G. V., and Ronnblom, L. (1999b). Anti-double-stranded dna antibodies and immunostimulatory plasmid dna in combination mimic the endogenous ifn-alpha inducer in systemic lupus erythematosus. *J Immunol*, 163(11):6306–13.
- Vaux, D. L. and Korsmeyer, S. J. (1999). Cell death in development. *Cell*, 96(2):245–54.
- Venigalla, R. K., Tretter, T., Krienke, S., Max, R., Eckstein, V., Blank, N., Fiehn, C., Ho, A. D., and Lorenz, H. M. (2008). Reduced cd4+,cd25- t cell sensitivity to the suppressive function of cd4+,cd25high,cd127 -/low regulatory t cells in patients with active systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 58(7):2120–30.
- Verbovetski, I., Bychkov, H., Trahtenberg, U., Shapira, I., Hareuveni, M., Ben-Tal, O., Kutikov, I., Gill, O., and Mevorach, D. (2002). Opsonization of apoptotic cells by autologous ic3b facilitates clearance by immature dendritic cells, down-regulates dr and cd86, and up-regulates cc chemokine receptor 7. *J Exp Med*, 196(12):1553–61.
- Vignali, D. A., Collison, L. W., and Workman, C. J. (2008). How regulatory t cells work. *Nat Rev Immunol*, 8(7):523–32.
- Vitali, C., Bencivelli, W., Isenberg, D. A., Smolen, J. S., Snaith, M. L., Sciuto, M., Neri, R., and Bombardieri, S. (1992). Disease activity in systemic lupus erythematosus: Report of the consensus study group of the european workshop for rheumatology research. ii. identification of the variables indicative of disease activity and their use in the development of an activity score. the european consensus study group for disease activity in sle. *Clin Exp Rheumatol*, 10(5):541–7.
- Vogler, I. (2005). *Influence of Annexin 1 and Its Domains on Cellular Immune Responses*. Masterarbeit.

- Vogt, K. and Vogt, C. (1842). *Untersuchungen ÜBer Die Entwicklungsge-schichte Der GeburtshelferkrÖTe (Aly-tes Obstetricans)*. Jent and Gassmann.
- Voll, R. E., Roth, E. A., Girkontaite, I., Fehr, H., Herrmann, M., Lorenz, H. M., and Kalden, J. R. (1997). Histone-specific th0 and th1 clones derived from systemic lupus erythematosus pa-tients induce double-stranded dna an-tibody production. *Arthritis Rheum*, 40(12):2162–71.
- Waldmann, H., Bemelman, F., and Cob-bold, S. (1998). Tolerance induction with cd4 monoclonal antibodies. *Novar-tis Found Symp*, 215:146–52; discussion 152–8, 186–90. 1528-2511 (Print) Jour-nal Article Review.
- Wallner, B. P., Mattaliano, R. J., Hessi-on, C., Cate, R. L., Tizard, R., Sinclair, L. K., Foeller, C., Chow, E. P., Browing, J. L., Ramachandran, K. L., and et al. (1986). Cloning and expression of hu-man lipocortin, a phospholipase a2 in-hibitor with potential anti-inflammatory activity. *Nature*, 320(6057):77–81.
- Walther, A., Riehemann, K., and Gerke, V. (2000). A novel ligand of the for-myl peptide receptor: Annexin i regula-tes neutrophil extravasation by interac-ting with the fpr. *Mol Cell*, 5(5):831–40.
- Wandl, U. B., Nagel-Hiemke, M., May, D., Kreuzfelder, E., Kloke, O., Kranzhoff, M., Seeber, S., and Niederle, N. (1992). Lupus-like autoimmune disease induced by interferon therapy for myeloprolifera-tive disorders. *Clin Immunol Immuno-pathol*, 65(1):70–4.
- Wardemann, H., Yurasov, S., Schaefer, A., Young, J. W., Meffre, E., and Nus-senzweig, M. C. (2003). Predomi-nant autoantibody production by ear-ly human b cell precursors. *Science*, 301(5638):1374–7.
- Waterhouse, P., Penninger, J. M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K. P., Thompson, C. B., Griesser, H., and Mak, T. W. (1995). Lymphopro-liferative disorders with early lethali-ty in mice deficient in ctla-4. *Science*, 270(5238):985–8.
- Weitzman, R. J. and Walker, S. E. (1977). Relation of titred peripheral pattern ana-to anti-dna and disease activity in sys-temic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis*, 36(1):44–9.
- Weyd, H. (2006). *Die Rolle Von Annexin I Auf Der OberfläChe Humaner Apopto-tischer Zellen*. Doktorarbeit.
- Wilder, R. L. (1998). Hormones, pregnan-cy, and autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci*, 840:45–50.
- Wong, C. K., Ho, C. Y., Li, E. K., and Lam, C. W. (2000). Elevation of proin-flammatory cytokine (il-18, il-17, il-12) and th2 cytokine (il-4) concentrations in patients with systemic lupus erythema-tosus. *Lupus*, 9(8):589–93.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., and Currie, A. R. (1980). Cell death: The signifi-can-ce of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68:251–306.
- Yamazaki, T., Yang, X. O., Chung, Y., Fukunaga, A., Nurieva, R., Pappu, B., Martin-Orozco, N., Kang, H. S., Ma, L., Panopoulos, A. D., Craig, S., Watowich, S. S., Jetten, A. M., Tian, Q., and Dong, C. (2008). Ccr6 regulates the migration of inflammatory and regulatory t cells. *J Immunol*, 181(12):8391–401.
- Yang, C. H., Tian, L., Ling, G. S., Trendell-Smith, N. J., Ma, L., Lo, C. K., Stott, D. I., Liew, F. Y., and Huang, F. P. (2008). Immunological mecha-nisms and clinical implications of regu-latory t cell deficiency in a systemic au-

- toimmune disorder: Roles of il-2 versus il-15. *Eur J Immunol*, 38(6):1664–76.
- Yang, Y. H., Morand, E. F., Getting, S. J., Paul-Clark, M., Liu, D. L., Yona, S., Hannon, R., Buckingham, J. C., Perretti, M., and Flower, R. J. (2004). Modulation of inflammation and response to dexamethasone by annexin 1 in antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, 50(3):976–84.
- Zou, H., Henzel, W. J., Liu, X., Lutschg, A., and Wang, X. (1997). Apaf-1, a human protein homologous to c. elegans ced-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, 90(3):405–13.
- Yang, Y. H., Morand, E. F., Getting, S. J., Paul-Clark, M., Liu, D. L., Yona, S., Hannon, R., Buckingham, J. C., Perretti, M., and Flower, R. J. (2004). Modulation of inflammation and response to dexamethasone by annexin 1 in

Erklärung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher an keiner anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht. Weiterhin erkläre ich, dass die Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit eingereicht wurde.

.....
Dipl. Biol. Cosima Kretz